

Veterinär-Anatomisches Institut
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Alois Boos

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von
Prof. Dr. Alois Boos

**Expression und zelluläre Lokalisation von PGRMC1 und PGRMC2 im Uterus
und Plazentom während der Trächtigkeit beim Rind**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Nora Maria Beyer

Tierärztin

aus Langenhagen, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Alois Boos, Referent

Prof. Dr. Ulrich Bleul, Korreferent

2017

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS:

1 Zusammenfassung	1
2 Summary	2
3 Einleitung.....	3
4 Literaturübersicht.....	5
4.1 Aufbau des bovinen Uterus	5
4.2 Der gravide Uterus.....	6
4.2.1 Plazenta	6
4.2.2 Interplazentomäre Uteruswand	9
4.3 Progesteron	10
4.3.1 Physiologische Funktion von Progesteron während der Gravidität.....	12
4.4 Progesteron-Rezeptoren	12
4.4.1 Nukleäre Progesteronrezeptoren	13
4.4.1.1 Struktur und Lokalisation	13
4.4.1.2 Isoformen	15
4.4.1.3 Vorkommen	16
4.4.2 PGRMC1	17
4.4.2.1 Entdeckung und Struktur der PGRMC1	17
4.4.2.2 Vorkommen und Lokalisation von PGRMC1	18
4.4.2.3 Funktionen von PGRMC1	20
4.4.2.3.1 Interaktion mit Häm	20
4.4.2.3.2 Steroidgenese	21
4.4.2.3.3 Membrantransport	21
4.4.2.3.4 Potenzieller Progesteronrezeptor	22
4.4.2.3.5 Tumorerkrankungen.....	23
4.4.3 PGRMC2	24
4.4.3.1 Entdeckung und Struktur von PGRMC2	24
4.4.3.2 Lokalisation und Vorkommen von PGRMC2	24
4.4.3.3 Funktionen von PGRMC2	26
4.4.3.3.1 Bindungspartner	26
4.4.3.3.2 Tumorerkrankungen.....	26
4.4.3.3.3 Reproduktionsgeschehen.....	26

4.4.4 mPR α , β und γ	27
4.4 Ziel des Projekts	29
5 Material und Methoden.....	30
5.1 Probengewinnung	30
5.1.1 Schlachttiere und Probenentnahme	30
5.1.1.1 Bestimmung des Trächtigkeitsalters	30
5.1.2 Probenaufarbeitung	30
5.1.2.1 Gewebeprevorbereitung für die RNA-Extraktion	31
5.1.2.2 Gewebeprevorbereitung für die Immunhistochemie.....	31
5.1.2.3 Gewebeprevorbereitung für die Proteinisolierung	32
5.2 Real Time(TaqMan)-PCR.....	32
5.2.1 RNA-Isolierung.....	32
5.2.2 DNase-Behandlung	33
5.2.3 Reverse Transkription	34
5.2.4 Semi-quantitative RealTime(TaqMan)-PCR	35
5.2.4.1 Prinzip	35
5.2.4.2 Durchführung	37
5.2.4.3 Auswertung	39
5.2.4.4 Statistik	40
5.3 Western Blot	40
5.3.1 Proteinisolierung	40
5.3.2 Gelelektrophorese	41
5.3.3 Auswertung	45
5.3.3.1 Statistik	45
5.4 Immunhistochemie.....	45
5.4.1 Prinzip	45
5.4.2 Durchführung	46
5.4.3. Kontrollen	48
6 Ergebnisse.....	49
6.1 PGRMC1 im bovinen Uterus und in der Plazenta während der Trächtigkeit	49
6.1.1 mRNA-Expression	49
6.1.2 Proteinexpression	51
6.1.3 Immunhistochemische Lokalisation	54
6.2 PGRMC2 im bovinen Uterus und in der Plazenta während der Trächtigkeit	60

6.2.1 mRNA-Expression	60
6.2.2 Proteinexpression	62
6.2.3 Immunhistochemische Lokalisation	65
6.3 Vergleich der Expression und zellulären Lokalisation von PGRMC1 und PGRMC2	71
7 Diskussion	72
7.1 Methodik	72
7.1.1 Probenmaterial	72
7.1.2 Bestimmung des Trächtigkeitsalters	73
7.1.3 Verwendete Analysemethoden	73
7.2 Nachweis von PGRMC1 und PGRMC2 in der interplazentomären Uteruswand	74
7.2.1 PGRMC1 und PGRMC2 im bovinen Myometrium	75
7.2.2 PGRMC1 und PGRMC2 im bovinen Endometrium	76
7.2.2.1 Endometriales Oberflächenepithel	76
7.2.2.2 Endometriales Stroma	77
7.2.2.3 Drüsenepithel	77
7.2.3 PGRMC1 und PGRMC2 in Endothelzellen der myometrialen und endometrialen Blutgefäße	78
7.3 Nachweis von PGRMC1 und PGRMC2 im Plazentom	79
7.3.1 PGRMC1 und PGRMC2 im maternalen Anteil des Plazentoms	81
7.3.1.1 Maternales Stroma	81
7.3.1.2 Maternales Epithel	82
7.3.2 PGRMC2 im fetalen Anteil des Plazentoms	82
7.3.3 PGRMC1 und PGRMC2 in Endothelzellen der maternalen und fetalen Blutgefäße	82
7.4 Schlussfolgerung	84
7.5 Ausblick	84
8 Literaturverzeichnis	86
9 Anhang	105
9.1 Abkürzungsverzeichnis	105
9.2 Abbildungsverzeichnis	109
9.3 Tabellenverzeichnis	111
9.4 Immunhistochemieprotokolle	112

9.5 Puffer und Lösungen	116
10 Danksagung	
11 Lebenslauf	

1 Zusammenfassung

Progesteron (P4) ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Gravidität beim Rind. Es kann seine Effekte durch nukleäre Progesteronrezeptoren (PGR) oder durch Interaktion mit membranständigen Rezeptoren vermitteln. Zwei davon sind die Progesteronrezeptor-membrankomponenten (PGRMC)1 und PGRMC2. Deren Vorkommen wurde in verschiedenen Geweben des weiblichen Reproduktionstraktes untersucht. Da aber kaum Daten über ihre Präsenz im bovinen Uterus und im Plazentom während der Trächtigkeit vorliegen, war das Ziel dieser Studie, die zelluläre Lokalisation sowie die mRNA- und Proteinexpression von PGRMC1 und 2 in beiden Strukturen während der Gravidität darzustellen. Proben von Uterus und Plazenta von 45 Schlachtrindern (n=5 Tiere/Trächtigkeitsmonat) wurden daher untersucht. Die Lokalisation zeigte ein spezifisches Muster: im Uterus waren beide Rezeptoren im Oberflächen- und Drüsenepithel, im Endothel der Blutgefäße und im Plazentom in maternalen Epithel- und Stromazellen sowie im Endothel der maternalen und fetalen Blutgefäße nachweisbar. PGRMC2 war zusätzlich im Chorionepithel vorhanden. Zwischen den einzelnen Trächtigkeitsmonaten gab es keine Veränderung in der Intensität der Immunreaktion, Lokalisation und mRNA- und Proteinexpression. Das Vorkommen und die zellspezifische Lokalisation beider Rezeptoren lassen vermuten, dass sie in die Vermittlung der nicht-genomischen P4-Antwort im Uterus und der Plazenta des Rindes involviert sind.

Schlüsselwörter: PGRMC1, PGRMC2, Rind, Uterus, Plazentom

2 Summary

Progesterone (P4) is mandatory for maintenance of pregnancy in cattle. It can mediate its effects by binding to nuclear progesterone receptors (PGR) or through interaction with membrane bound receptors. Two of those are the progesterone receptor membrane components (PGRMC)1 and 2. The distribution patterns of both receptors have been examined in different female reproductive tissues, but there is little data about their presence in the bovine uterus and placentomes during pregnancy. Therefore, the aim of this study was to demonstrate the cellular localisation, mRNA and protein expression of PGRMC1 and 2 in both kinds of tissue during pregnancy. Tissue from 45 cows (n=5 per month of pregnancy) were investigated. There was a specific distribution pattern in the cellular localisation: in the uterus both receptors were detected in cells of luminal and glandular epithelium, in endothelia of blood vessels and in placentomes in the maternal epithelium and stroma as well as in the endothelia of fetal and maternal blood vessels. PGRMC2 was also present in the chorionic epithelium. There were no variations in the mRNA- and protein expression patterns observed throughout gestation, neither in the uterus, nor in the placentomes. The incidence of these potential receptors and the specific cellular localisation suggests that PGRMCs are probably involved in nongenomic action of P4 in bovine uterus and placentomes during pregnancy.

Keywords: PGRMC1, PGRMC2, cattle, uterus, placentome

3 Einleitung

Das Sexualsteroidhormon Progesteron ist als biologischer Botenstoff einer der wichtigsten Regulatoren des reibungslosen Ablaufs der weiblichen Reproduktion. Zu den bedeutendsten Zielstrukturen dieses Hormons gehören die Gebärmutter, die Ovarien, die Milchdrüsen und das Gehirn. Dabei nimmt es vor allem bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Gravidität bei Säugetieren und beim Menschen eine Schlüsselrolle ein (Graham and Clarke, 1997). Hauptsächlich in den großen Luteinzellen des Gelbkörpers im Ovar produziert, wirkt es als Botenstoff durch seine gut charakterisierten nukleären Rezeptoren, welche zu der großen Familie der Liganden-abhängigen Transkriptionsfaktoren gehören (Gellersen et al., 2009). Es existieren allerdings auch Progesteroneffekte, die bereits nach Sekunden oder Minuten eintreten und somit nicht durch den genomischen Signalübertragungsweg erklärbar sind. Es wird vermutet, dass die schnelle Progesteronantwort durch sogenannte nicht-klassische membranständige Progesteronrezeptoren vermittelt wird (Falkenstein and Wehling, 2000; Losel and Wehling, 2003; Gellersen et al., 2009). Zwei Gruppen dieser potenziellen membranassoziierten Rezeptoren sind bereits bekannt: Zum einen die Familie der Progestin- und AdipoQ-Rezeptoren (PAQR), welche drei mögliche Kandidaten beinhaltet, nämlich die Membran Progestin Rezeptoren (mPR) α , β und γ (Zhu et al., 2003b; Gellersen et al., 2009). Zum anderen gibt es die Progesteronrezeptor-Membrankomponenten (PGRMC)1 und PGRMC2, welche der membranassoziierten Progesteronrezeptorproteinfamilie (MAPR) angehören (siehe Übersicht Mifsud and Bateman, 2002; Cahill, 2007). Während die mPRs als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren agieren und nach der Bindung von Progesteron eine Signalkaskade mithilfe eines Second-Messenger-Systems auslösen, besteht über die genaue Vermittlung der Progesteronantwort durch die PGRMCs noch Unklarheit (siehe Übersichten Dressing et al., 2011; Kowalik et al., 2013a; Cahill et al., 2016; Cahill, 2017). Es könnte sein, dass sie durch Bindung von Progesteron, was noch nicht definitiv belegt ist und eher ausgeschlossen wird (Min et al., 2004), ebenfalls über Second-Messenger-Systeme agieren (siehe Übersicht Kowalik et al., 2013a). Viel eher wird aber davon ausgegangen, dass sie ihren Teil der Progesteronantwort indirekt, als Teil eines vielschichtigen Progesteron-Bindungs-Komplexes wahrnehmen (Peluso, 2006; Cahill, 2007; Thomas et al., 2014). Hierbei besteht allerdings noch Klärungsbedarf, welche Bindungspartner eine Rolle spielen. Fest steht aber, dass die PGRMCs in die Vermittlung von Progesteroneffekten involviert und damit essentiell für dessen Wirkung sind (siehe Übersicht Cahill, 2007; Cahill et al., 2016).

Neben dem nukleären Progesteronrezeptor und den mPRs, wurden auch die PGRMCs in vielen verschiedenen Spezies, sowohl in Strukturen des weiblichen und männlichen Reproduktionstraktes, als auch in unterschiedlichen, nicht zu diesem System gehörenden Geweben nachgewiesen (siehe Übersicht Kowalik et al., 2013a). Im Ersteren sind sie vor allem für die Vermittlung der Ruhigstellung des Myometriums während der Gravidität (Wu et al., 2011), den antiapoptotischen Effekt auf Granulosazellen des Ovars (Engmann et al., 2006; Peluso et al., 2006) sowie der Akrosomenreaktion bei den Spermien wichtig (Losel et al., 2005). Zusätzlich hat man sie auch mit veränderten Expressionsmustern bei vielen pathologischen Prozessen, wie zum Beispiel Krebs (Causey et al., 2011; Albrecht et al., 2012), Endometriose (Keator et al., 2012; Bunch et al., 2014) und vorzeitigen Wehen (Wu et al., 2011) identifizieren können. Mit ihrer Präsenz und Funktion in den Geschlechtsorganen des Rindes haben sich bislang allerdings nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigt. Neben den Studien über das Vorkommen der PGRMCs im bovinen Uterus, im Gelbkörper und im Eileiter während des Östruszyklus und den ersten drei Monaten der Trächtigkeit (Kowalik and Kotwica, 2008; Luciano et al., 2011; Saint-Dizier et al., 2012; Slonina et al., 2012; Kowalik et al., 2013b; Kowalik et al., 2016), gibt es nur noch Untersuchungen am bovinen Endometrium (Takahashi et al., 2016) und an bovinen Oozyten (Luciano et al., 2010; Aparicio et al., 2011). Im Gegensatz zum nukleären Progesteronrezeptor, dessen Präsenz und Lokalisation vor allem von Boos et al. und Schuler et al. im bovinen Uterus und Plazentom eingehend untersucht wurden (Boos et al., 1996; Schuler et al., 1999; Boos et al., 2000; Boos et al., 2006), existieren nur wenige, beziehungsweise unvollständige Daten über das Vorkommen und besonders über die zelluläre Lokalisation der PGRMCs im Uterus des Rindes während der Trächtigkeit. Bezüglich des bovinen Plazentoms existieren, auch nach ausführlicher Recherche in verschiedenen Datenbanken, keine Informationen über PGRMCs. Um diesem Informationsmangel Abhilfe zu schaffen, wurde diese Studie durchgeführt. Ziel ist es, sich ein umfassendes Bild über das Vorkommen und das zelluläre Expressionsmuster von PGRMC1 und PGRMC2 in der interplazentomären Uteruswand und im Plazentom des Rindes über die neun Monate der Trächtigkeit zu verschaffen, welches in Folgestudien, zum Beispiel über deren Funktionalität beziehungsweise deren Teilnahme am Geburtsgeschehen und an pathologischen Prozessen beim Rind, aber auch bei anderen Säugetieren und dem Menschen, grundlegende Informationen liefern kann.

4 Literaturübersicht

4.1 Aufbau des bovinen Uterus

Die Gebärmutter (lateinisch Uterus, griechisch Metra, Hystera) ist das Organ, wie der Name schon sagt, welches die Lebens- und Entwicklungsbedingungen des Keimlings von der Einnistung der Blastozyste bis hin zur Austreibung der Frucht bei der Geburt bietet (Schäubli, 2005; König and Aurich, 2012)

Der Uterus der Rinder ist makroskopisch hauptsächlich aus drei Anteilen aufgebaut: Er beginnt kaudal mit dem dickwandigen Uterushals (Cervix uteri), welcher mit der Vagina durch den äußeren Muttermund (Ostium uteri externum) und der Höhle des Uteruskörpers durch den inneren Muttermund (Ostium uteri internum) verbunden ist. Der einheitliche Uteruskörper (Corpus uteri) setzt sich beim Rind in zwei nach ventral gebogene Uterushörner (Cornua uteri) fort. Durch diese kraniale Zweiteilung des Uterus wird er auch Uterus bicornis subseptus genannt (König and Aurich, 2012). In der Uteruswand lassen sich strukturell drei Schichten unterteilen: die Schleimhaut (Tunica mucosa, Endometrium), die Muskelschicht (Tunica muscularis, Myometrium) und der seröse Überzug (Tunica serosa, Perimetrium) (König and Aurich, 2012). Die Uterushöhle wird durch das Endometrium ausgekleidet. Dieses ist seinerseits wiederum in zwei Schichten unterteilbar, in eine lumenseitige Lamina epithelialis mucosae und eine sich anschließende Lamina propria mucosae. Die Lamina epithelialis, eine dünne Schicht aus hochprismatischen Epithelzellen, stellt das sogenannte einfache oder mehrreihige Oberflächenepithel (OE) dar (Weyrauch et al., 1998). Die Lamina propria mucosae, oder auch Stroma endometrialis genannt, ist ein zell- und drüsenreiches Schleimhautbindegewebe. Es besteht aus Gefäßen, Fibroblasten beziehungsweise Fibrozyten, Zellen der Immunabwehr und enthält zahlreiche verzweigte, tubulöse Uterindrüsen (Glandulae uterinae), welche ein einschichtiges hochprismatisches Epithel aufweisen (Liebich and Budras, 2010). Das Endometrium des Rindes zeigt regelmäßige Erhebungen, welche sich als sogenannte Karunkeln (Carunculae) charakterisieren lassen und bei einer Trächtigkeit zum Ort der Plazentation werden. Innerhalb dieser Karunkeln lassen sich keine Uterindrüsen in der zellreichen Lamina propria mucosae, die den strukturellen Hauptanteil daran ausmacht, finden. Das Vorkommen der Drüsen beschränkt sich somit auf den interkarunkulären Bereich der Lamina propria mucosae (Weyrauch et al., 1998). Sowohl das Oberflächenepithel als auch die Drüsen sind hormonellen, zyklusabhängigen Veränderungen unterworfen. Sich dem Endometrium anschließend, folgt das Myometrium, eine sehr ausgeprägte zweilagige Muskelschicht.

Sie bildet den größten Anteil des Uterus und ist besonders wichtig für die Vermittlung der Kontraktionen bei der Austreibung der Frucht unter der Geburt. Nach einer dicken, inneren, zirkulären Schicht aus glatten Muskelzellen, dem Stratum musculare circulare, folgt ein bindegewebs- und gefäßreiches Stratum vasculare, welchem eine schwächere, äußere, longitudinale Muskelschicht, das Stratum musculare longitudinale, anliegt (König and Aurich, 2012). Dem Myometrium schließt sich die Tunica serosa (Perimetrium) als äußere einschichtige, von einer bindegewebigen Lamina propria serosae unterlagerten, Epithelialschicht des Uterus in Richtung Bauchhöhle an (Liebich and Budras, 2010).

4.2 Der gravide Uterus

Der gravide Uterus durchläuft starke strukturelle Veränderungen, um seinen Aufgaben gerecht zu werden. Sowohl der Vollzug der Plazentation an den Karunkeln, bei denen die sogenannten Plazentome entstehen, als auch die morphologischen Variationen des Myometriums, des endometrialen Oberflächenepithels und der Uterindrüsen in der interplazentären Uteruswand machen dies deutlich.

4.2.1 Plazenta

Kommt es beim Rind zur Befruchtung der Eizelle und damit zu einer Gravidität, folgt auf die Implantation der Blastozyste am 18. - 19. Tag der Trächtigkeit, die Plazentation. Die Plazenta ist das fetomaternale Austauschorgan und besteht aus dem maternalen Endometrium (Placenta materna) und dem Chorion (Placenta fetalis). Bei der Plazentation kommt es zu einem Ineinandergreifen der mütterlichen und fetalen Strukturen mit tierartlich unterschiedlich weit gehendem Gewebsuntergang auf der maternalen Seite (Schnorr and Kressin, 2011). Das Rind besitzt eine Plazenta epitheliochorialis (Schnorr and Kressin, 2011), bei der alle Gewebsschichten, sowohl auf der maternalen als auch auf der fetalen Seite vollständig erhalten bleiben. Das maternale Blutgefäßendothel wird durch das Uterusepithel, gefolgt vom einschichtigen Chorionepithel, sowie dem Stroma auf beiden Seiten, von den fetalen Blutgefäßendothelien getrennt (siehe Abbildung 1) (Schnorr and Kressin, 2011). Das fetale Chorion bildet bereits ab dem 15. und 16. Trächtigkeitstag sogenannte Primärzotten, welche ungefähr in der vierten Trächtigungswoche in Kontakt mit den mütterlichen Karunkeln treten und sich im Folgenden beim Rind zu Zottenbüscheln, den Kotyledonen formatieren (Schlafer et al., 2000). Hierbei stülpen sich die Kotyledonen mit den sich ausbildenden Primär-, Sekundär- und Tertiärzotten fingerförmig in die, zum größten Teil aus der Lamina propria

mucosae bestehenden und mit maternalem Epithel ausgekleideten Krypten der Karunkeln ein (Winter, 2007; Schnorr and Kressin, 2011). Der Kontakt zwischen Placenta materna und Placenta fetalis wird durch einen jeweils ineinandergreifenden Mikrovillibesatz der beiden Epithelien intensiviert und die kommunizierende Oberfläche dadurch deutlich vergrößert (Bjorkman and Bloom, 1957). Die umschriebene Verbindung der Chorionzotten mit dem maternalen Endometrium im Bereich der Karunkeln nennt man Plazentom (Schlafer et al., 2000; Winter, 2007; Schnorr and Kressin, 2011). Die maternalen Karunkeln und damit die Plazentome sind im Uteruskörper und in beiden Uterushörnern gleichmäßig in vier Reihen, jeweils zwei mesometriale und antimesometriale, angeordnet (Schlafer et al., 2000). Deshalb spricht man bei der Placenta der Wiederkäuer auch von einer Placenta multiplex seu cotyledonaria (Schnorr and Kressin, 2011). Aufgrund der Menge der Plazentome, ungefähr 100, die während der Gravidität nicht in ihrer Anzahl variieren aber an Größe zunehmen, werden Rinder auch als Polycotyledontophoren bezeichnet (Atkinson et al., 1984; Schlafer et al., 2000; Schnorr and Kressin, 2011). Die Zotten des fetalen Chorions weisen neben Bindegewebe ein einschichtiges Epithel auf. Dieses sogenannte Chorionepithel wird aus Trophoblastzellen gebildet. Neben uninukleären existieren auch binukleäre und mehrkernige Trophoblastzellen, welche auch als Trophoblastriesenzellen, englisch Trophoblast Giant Cells (TGC), bezeichnet werden (Bjorkman and Bloom, 1957; Wooding, 1983; Schlafer et al., 2000; Schnorr and Kressin, 2011). Funktionen dieser grossen Trophoblastzellen sind unter anderem die Produktion von verschiedenen Hormonen und Wachstumsfaktoren (Schlafer et al., 2000; Winter, 2007). Neben Progesteron (Reimers et al., 1985; Ullmann and Reimers, 1989), Östrogen und Östradiol (Matamoros et al., 1994) werden auch bovines plazentares Laktogen (bPL) (Duello et al., 1986; Wooding and Beckers, 1987; Nakano et al., 2001), Prolaktin-Related-Protein (Yamada et al., 2002) und verschiedene Trächtigkeits-assoziierte Glykoproteine, wie bPAG-1, -2 und -3 (Roberts et al., 1995), von ihnen synthetisiert. Es wird vermutet, dass die sogenannten binukleären Trophoblastzellen mit den Uterusepithelzellen fusionieren und dadurch Hybridzellen aus dem fetalen und maternalen Individuum entstehen (Wooding and Wathes, 1980; Wooding, 1982; Wooding and Beckers, 1987; Wooding, 1992; Schlafer et al., 2000).

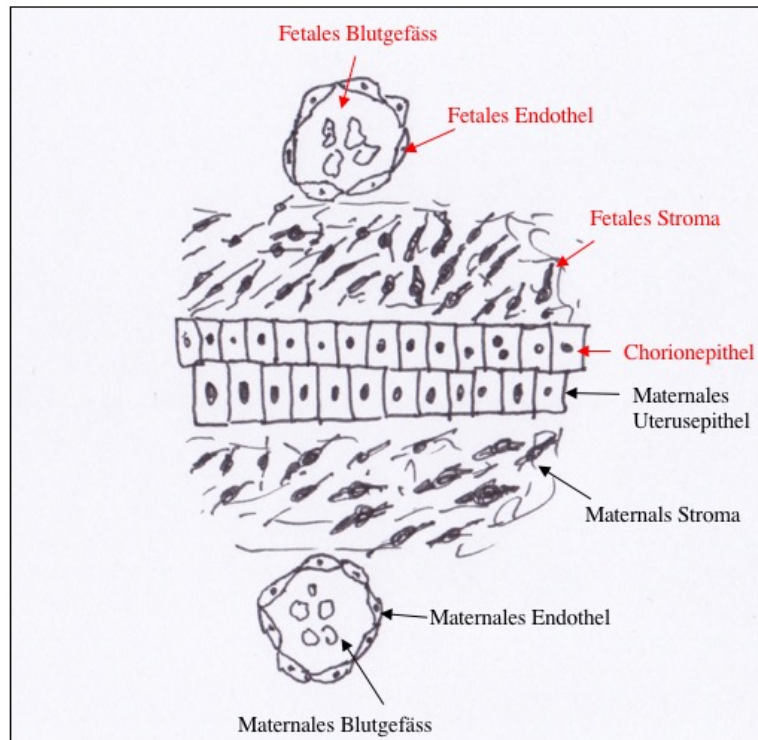


Abbildung 1: Graphische Darstellung der Gewebsschichten der fetomaternalen Transferstrecke, modifiziert nach Schnorr und Kressin (Schnorr and Kressin, 2011)

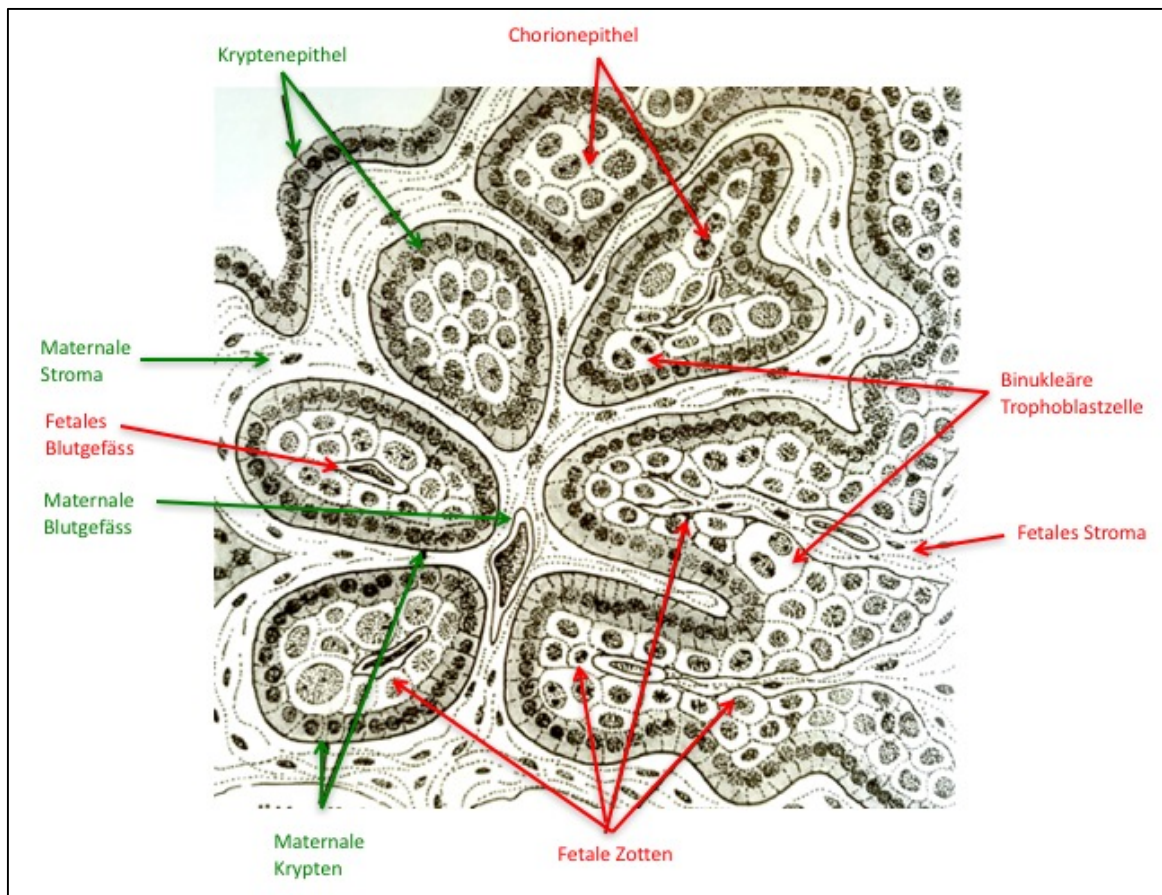


Abbildung 2: Ausschnitt aus dem bovinen Plazentom, modifiziert nach Schnorr und Kressin (Schnorr and Kressin, 2011)

4.2.2 Interplazentomäre Uteruswand

Der Bereich zwischen den einzelnen Plazentomen, die sogenannte interplazentomäre Uteruswand, zeigt eine deutliche morphologische Veränderung im Laufe der Gravidität: Das endometriale Oberflächenepithel ist ab dem 18. Trächtigkeitstag deutlich abgeflacht, was als Vorbereitung auf den Kontakt mit dem fetalen Chorion anzusehen ist (King et al., 1981), denn auch zwischen den Plazentomen tritt das Chorion mit dem mütterlichen Endometrium in Kontakt und soll auch hier am Stoffaustausch zwischen fetalem und maternalem Gewebe beteiligt sein (Bjorkman, 1956). In der bindegewebigen Schicht des Endometriums, der Lamina propria mucosae, kommt es zu Umstrukturierungen in Form einer veränderten, von Boos et al. beschriebenen, Zusammensetzung der Kollagentypen I, III und IV (Boos et al., 2003b; Albers, 2007; Albers et al., 2015). Außerdem zeigen die im endometrialen Stroma gelegenen uterinen Drüsen eine Hypertrophie und dilatieren im Verlauf der Gravidität (Albers, 2007; Albers et al., 2015). Die Uterindrüsen produzieren die sogenannte Histiotrophe (Uterinmilch) und sezernieren sie, sodass sie vom fetalen Epithel durch Phagozytose und Pinozytose aufgenommen werden kann und damit zu der Ernährung des Fötus beiträgt (Albers, 2007; Schnorr and Kressin, 2011). Im Myometrium zeigt sich zudem eine Hypertrophie der glatten Muskelzellen im Verlaufe der Trächtigkeit (Zheng et al., 1996; Albers et al., 2015)

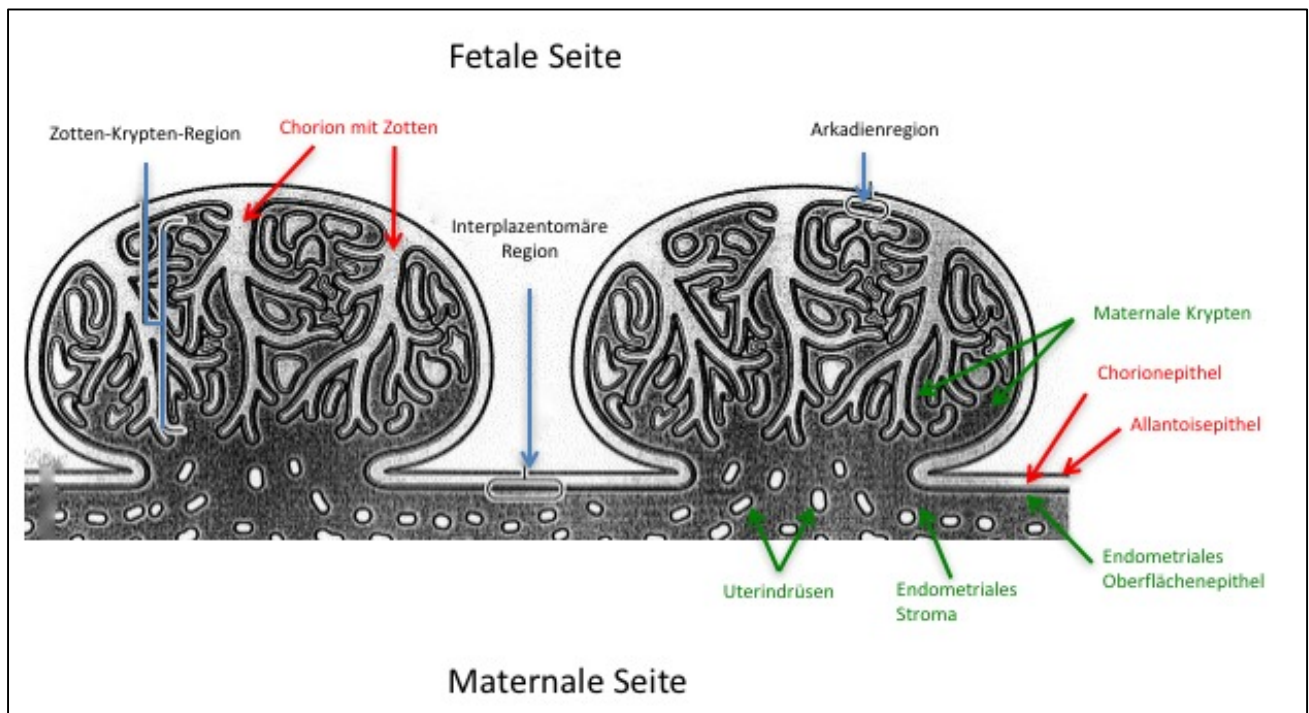


Abbildung 3: Bovine interplazentomäre Region, modifiziert nach Davies et al. (Davies et al., 2000)

4.3 Progesteron

Progesteron ist ein Steroidhormon und gehört zusammen mit Pregnandiol und Pregnenolon zu der Gruppe der Gestagene, der sogenannten Gelbkörper- oder Schwangerschaftshormone. Die Gestagene besitzen 21 Kohlenstoffatome (C_{21}) (siehe Abbildung 4) und bilden zusammen mit den Androgenen (C_{19}) und den Östrogenen (C_{15}) die drei wichtigsten Hauptklassen der Sexualhormone. Alle Steroidhormone leiten sich von Cholesterin (C_{27}) als Vorstufe ab. Bei der Biosynthese (siehe Abbildung 5) der Steroide aus Cholesterin spielen Oxidations- und Hydroxylierungsreaktionen eine herausragende Rolle. Für die Hydroxilierung sind die Substrate Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Sauerstoff (O_2) nötig, wobei zuerst eine Aktivierung des Sauerstoffs erfolgen muss. Bei der Biosynthese der Steroidhormone wird diese Aktivierung durch ein Cytochrom P_{450} -Enzym, einem in der Mitochondrienmembran lokalisierten Protein, realisiert (Stryer and Stoll, 1996). Das Progesteron wird bei den weiblichen Säugetieren und dem Menschen hauptsächlich über Pregnenolon aus Cholesterin im Ovar, genauer gesagt in den Luteinzellen des Gelbkörpers, Corpus luteum (CL), synthetisiert. Zusätzlich wird es auch in der Plazenta und in geringen Mengen in der Nebenniere produziert (Graham and Clarke, 1997). Das Enzym Desmolase kann durch eine Hydroxilierung der C_{20} - und C_{22} -Atome die C_6 -Einheit der Seitenkette des Cholesterins oxidativ abspalten und es entsteht Pregnenolon (C_{21}). Aus dem Pregnenolon wird durch Oxidation und Isomerisierung über zwei Schritte das Progesteron gebildet, welches durch weitere Hydroxylierungen zu Kortisol, Aldosteron, sowie zu Androgenen und Östrogenen umgebaut werden kann (Stryer and Stoll, 1996). Stimuliert wird die Progesteronsynthese in den Luteinzellen durch das luteinisierende Hormon (LH), ein sogenanntes luteotropes Hormon (Marsh et al., 1966; Niswender et al., 2000). Das gebildete Progesteron reduziert seinerseits durch einen negativen Feedbackmechanismus die Frequenz und Höhe der pulsatischen Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Freisetzung aus dem Hypothalamus und verhindert somit eine weitere Ovulation vorhandener Follikel (Meinecke, 2000; Robinson et al., 2000).

Dem Progesteron kommt innerhalb der weiblichen Reproduktion somit eine Schlüsselrolle zu und nebst dem Uterus sind die wichtigsten Zielstrukturen dieses Hormons, in die es regulierend eingreift, die Ovarien, die Milchdrüse und das Gehirn. Aber auch in anderen Gewebearten, wie dem kardiovaskulären System, den Knochen und dem zentralen Nervensystem nimmt es eine wichtige Position ein (Graham and Clarke, 1997; Conneely et al., 2000; Graham and Clarke, 2002).

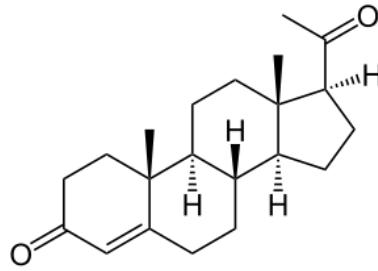


Abbildung 4: Strukturformel von Progesteron

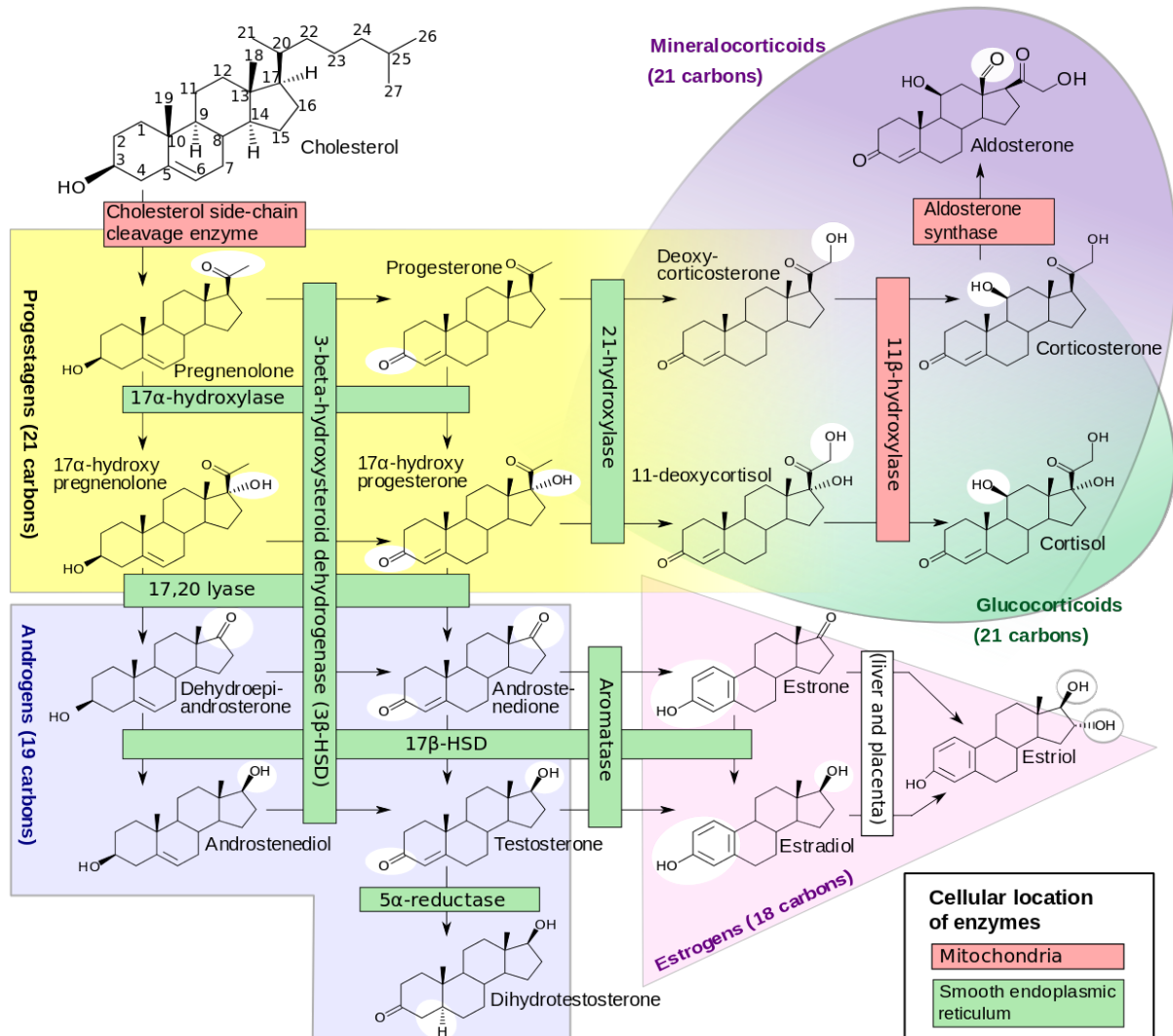


Abbildung 5:) "Diagram of the pathways of human steroidogenesis". WikiJournal of Medicine (Häggström and Richfield, 2014)

Dargestellt ist die Steroidgenese beim Menschen aus Cholesterin mit den darin involvierten Enzymen. HSD: Hydroxysteroid-Dehydrogenase; rot: Lokalisation der Enzyme in den Mitochondrien; grün: Lokalisation der Enzyme im glatten Endoplasmatischen Retikulum; gelb: Gestagene; hell lila: Androgene; rosa: Östrogene; hellgrün: Glukokortikoide; dunkel lila: Mineralkortikoide; weisse Kreise: stellen Veränderungen in der Molekularstruktur dar (Häggström and Richfield, 2014)

4.3.1 Physiologische Funktion von Progesteron während der Gravidität

In der ungefähr 280 Tage andauernden Trächtigkeit des Rindes spielt, wie bei allen anderen Säugetieren, das Progesteron für die Vorbereitung, Implantation und Erhaltung der Gravidität eine herausragende Rolle (Graham and Clarke, 1997). Während der Trächtigkeit ist die Hauptquelle des Progesterons zunächst der Gelbkörper im Ovar. Zusätzlich kann auch die Plazenta Progesteron in speziesabhängiger Menge synthetisieren. Dies geschieht beim Rind hauptsächlich in den binukleären Trophoblastzellen (Reimers et al., 1985) und kann im Gegensatz zu anderen Spezies erst zwischen dem 180. - 250. Trächtigkeitstag für die alleinige Aufrechterhaltung der Gravidität sorgen (Estergreen et al., 1967; Schuler et al., 2008). Die wichtigsten Effekte des Progesterons während der Trächtigkeit sind am Endometrium und Myometrium zu beobachten. Während es im Endometrium durch das Progesteron beim Menschen zu einem Wachstum und zum Aufrollen der Spiralarterien, einer sekretorischen Transformation der Uterindrüsen und zum Einwandern unterschiedlicher Immunzellen kommt, nimmt im Myometrium die Kontraktilität deutlich ab (Gellersen et al., 2009). Die essentielle Ruhigstellung des Myometriums während der Trächtigkeit, ausgelöst durch unterschiedliche Progesteron-abhängige Mechanismen, bezeichnet man auch als den sogenannten Progesteronblock (Meinecke, 2000). Progesteron kann die intrazelluläre Kalziumkonzentration sowie die Konzentration von Prostaglandinen und Oxytocin vermindern, welche maßgeblich an der Kontraktion des Myometriums beteiligt sind (Graham and Clarke, 1997). Es kommt dabei zu einer Hemmung der Prostaglandinsynthese und zur Verminderung der Oxytocinrezeptoren (Thorburn and Challis, 1979; Sheldrick and Flick-Smith, 1993; Graham and Clarke, 1997).

4.4 Progesteron-Rezeptoren

Das lipophile Hormon Progesteron kann als biochemischer Botenstoff seine mannigfaltigen Effekte durch verschiedene Wege in der Zielzelle realisieren. Auf der einen Seite wird ein Großteil der biologischen Antworten von Progesteron, wie bei allen lipophilen Steroidhormonen, anhand seines klassischen nukleären Progesteronrezeptors (PGR) auf genomischem Wege vermittelt (Gellersen et al., 2009). Dies geschieht über Transkription bestimmter Gene und der sich anschließenden Neusynthese von Proteinen, was eine Zeitspanne von Stunden bis Tagen in Anspruch nimmt. Auf der anderen Seite sind in den letzten Jahrzehnten neue, potentielle membranständige Progesteronrezeptoren entdeckt worden, durch die Progesteron mittels nicht-genomischer Effekte seine Wirkung innerhalb kürzester Zeit entfalten kann (Losel and Wehling, 2003; Gellersen et al., 2009). Es existieren zwei Gruppen von sogenannten nicht-klassischen Progesteronrezeptoren, welche die

Progesteronantwort innerhalb von Sekunden bis Minuten einleiten. Zum einen handelt es sich um die membranassoziierte Progesteronrezeptor (MAPR)-Proteinfamilie, welche die beiden Progesteronrezeptor-Membrankomponenten (PGRMC)1 und PGRMC2 beinhaltet (Mifsud and Bateman, 2002; Cahill, 2007; Gellersen et al., 2009). Zum anderen existieren die Membran-Progestin-Rezeptoren (mPR) α , β und γ , welche der Familie der Progestin- und AdipoQ-Rezeptoren (PAQR) zugehörig sind (Zhu et al., 2003b; Gellersen et al., 2009)

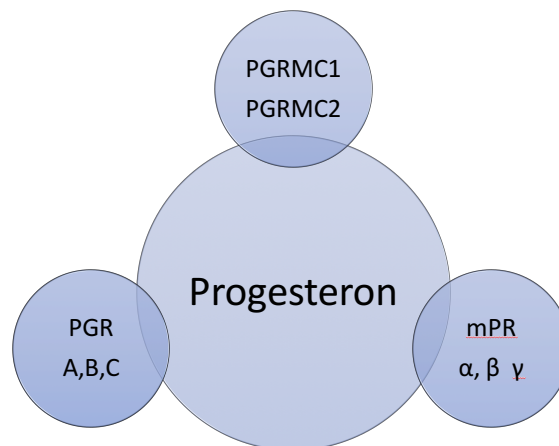


Abbildung 6: Progesteron und seine potenziellen Rezeptoren

mPR: Membrane Progestin Rezeptor; PGR: nukleärer Progesteronrezeptor; PGRMC: Progesteronrezeptor-Membrankomponente

4.4.1 Nukleäre Progesteronrezeptoren

4.4.1.1 Struktur und Lokalisation

Der klassische nukleäre Progesteronrezeptor (PGR) gehört, wie alle anderen Steroidhormonrezeptoren zur Superfamilie der Nuklearrezeptoren (Bramley, 2003). Er fungiert als Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor (Tsai and O'Malley, 1994; Weigel, 1996) und besitzt 3 verschiedene Isoformen: PGR-A, PGR-B und PGR-C, welchen jeweils eine unterschiedliche Rolle in der Zelle zukommt (siehe Übersicht Kowalik et al., 2013a). Die Nuklearrezeptoren sind Proteine, die jeweils aus verschiedenen Domänen aufgebaut sind (siehe Abbildung 7). Am N-Terminus des Rezeptors befinden sich drei Domänen. Zwei davon sind die Activation-Function-1 (AF-1) und AF-3, welche verschiedene Transkriptionsfaktoren binden können. Die dritte Domäne, Inhibitory Domain (ID), die zwischen den beiden ersten liegt, übt eine hemmende Funktion aus, indem sich an sie Progesteronantagonisten anlagern können. Neben der AF-1-Domäne befindet sich eine Bindungsdomäne für

Desoxyribonukleinsäure, englisch Desoxyribonucleic Acid (DNA), die DNA-Binding Domain (DBD). Sie besitzt zwei Zinkfinger-Strukturen und ist verantwortlich für die Bindung des Progesteron-Rezeptor-Komplexes mit dem im Zielgen lokalisierten Hormone-Response-Element (HRE) (Tsai and O'Malley, 1994; Giangrande et al., 1997). Am Carboxyl-Terminus des Rezeptors befindet sich die Ligandenbindungsdomäne, englisch Ligand-Binding Domain (LBD), an der das Progesteron gebunden wird. Innerhalb dieser Domäne existiert noch eine transkriptionale Aktivierungsdomäne, AF-2, welche in Interaktion mit den Hitzeschockproteinen (HSP) tritt und somit für die zelluläre Lokalisation des Rezeptors verantwortlich ist (Kowalik et al., 2013a). Die Hitzeschockproteine (HSP), unter anderem HSP-70 und HSP-90, sowie die Immunophiline bilden einen Komplex mit dem inaktivierten und im Zytoplasma lokalisierten Progesteronrezeptor (Cheung and Smith, 2000; Kowalik et al., 2013a). Durch diese Komplexbildung liegt der Rezeptor in einer speziellen Konformation vor, welche die Bindung eines spezifischen Liganden zulässt (Beato et al., 1996). Durch die Anlagerung eines Liganden an die LBD kommt es durch die Dissoziation der Hitzeschockproteine und der Immunophiline zu einer Konformationsänderung und somit zur Aktivierung des Progesteronrezeptors (Allan et al., 1992; Smith, 2000). Es folgt eine Translokation in den Zellkern, wo der Rezeptor dimerisiert und an die HRE des Zielgens bindet (Conneely and Lydon, 2000). Der Progesteronrezeptor kann als Homodimer oder Heterodimer binden und erhöht somit die Diversität der biologischen Antworten auf Progesteron (Mulac-Jericevic and Conneely, 2004; Rekawiecki et al., 2011; Kowalik et al., 2013a). An dem gebildeten Dimer können verschiedene Kofaktoren (Koaktivatoren oder Korepressoren) binden, die Einfluss auf die Transkription nehmen können (Walters and Nemere, 2004). Im Anschluss daran findet die Transkription des Zielgens mithilfe des Enzyms RNA-Polymerase (Ribonukleinsäure, englisch ribonucleic acid (RNA)) statt und es folgt die Synthese von neuen Proteinen (Stryer and Stoll, 1996). Diese neu gebildeten Proteine, die unterschiedlich in den Zellmechanismus eingreifen können, sind die biologische Antwort auf die Bindung des Progesterons an seinen nukleären Rezeptor.

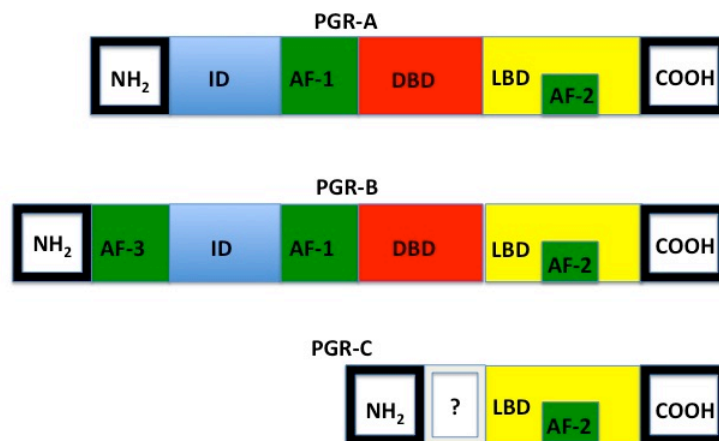


Abbildung 7: Schematische Darstellung der verschiedenen Isoformen der PGR des Menschen, modifiziert nach Kowalik et al. (Kowalik et al., 2013a)

AF-1, -2 und -3: Aktivierungsdomänen; ID = hemmende Domäne; DBD: DNA-Bindungsdomäne; LBD: Ligand-Bindungsdomäne

4.4.1.2 Isoformen

Die beiden Isoformen PGR-A und PGR-B stammen vom selben auf dem Chromosomen 11 lokalisierten und aus 8 Exons bestehenden Gen ab (Misrahi et al., 1993). Der Unterschied der beiden Isoformen liegt im Aufbau des N-Terminus. Im Gegensatz zu PGR-B, fehlt PGR-A die AF-3 Domäne. Durch verschiedene Studien mit selektiver Entfernung von PGR-A oder PGR-B konnte beiden Isoformen unterschiedliche Funktionen zugewiesen werden (Conneely et al., 2000; Conneely and Jericevic, 2002; Mulac-Jericevic and Conneely, 2004). PGR-B ist ein starker Aktivator von Progesteron-abhängigen Genen in verschiedenen Zellen. Im Gegensatz dazu vermindert PGR-A den Effekt des Progesterons auf die Zielzellen, indem es hemmend auf PGR-B einwirkt. Folglich ist also das Verhältnis der beiden vorliegenden Isoformen mitverantwortlich für den biologischen Effekt von Progesteron (siehe Übersicht Pieber et al., 2001; Kowalik et al., 2013a). Die Isoform PGR-C besitzt nur eine Zinkfingerstruktur und keine DBD und kann somit nicht direkt die Transkription von Genen aktivieren (Wei and Miner, 1994; Taylor et al., 2009), aber sie kann mit PGR-A und -B Heterodimere bilden und somit deren Transkriptionseigenschaften beeinflussen (Wei and Miner, 1994; Wei et al., 1996). Die genaue Funktion der dritten Isoform, des PGR-C ist noch nicht vollständig entschlüsselt (siehe Übersicht Kowalik et al., 2013a).

4.4.1.3 Vorkommen

Der nukleäre Progesteronrezeptor wird in verschiedenen Gewebearten exprimiert. Er kommt im Ovar (Horie et al., 1992), Uterus (Thijssen, 2005), Hoden (Abid et al., 2008), Gehirn (Brinton et al., 2008), Knochen (Bland, 2000), in der Bauchspeicheldrüse (Doglioni et al., 1990), Milchdrüse (Branchini et al., 2009) und im Harntrakt (Batra and Iosif, 1987) vor und wurde sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen anderen Spezies nachgewiesen (siehe Übersicht Kowalik et al., 2013a). Mehrere Arbeitsgruppen haben das Vorkommen der PGRs im weiblichen Reproduktionstrakt des Rindes untersucht. Rekawiecki et al. haben die Expression der PGRs im Corpus luteum untersucht (Rekawiecki et al., 2015). Robinson et al. und Boos et al. wiesen die PGRs im Endometrium während des Östruszyklus nach (Boos et al., 1996; Robinson et al., 2001) und Kowalik et al. und Slonina et al. untersuchten die PGRs in der Uteruswand während des Östruszyklus und den ersten drei Monaten der Trächtigkeit (Slonina et al., 2012; Kowalik et al., 2013b). Im Corpus luteum zeigten sich die höchsten mRNA- und Proteinmengen der Isoformen PGRA und PGRB zu Beginn (Tag 1-5) des Östruszyklus. Nach einem Abfall an den Zyklustagen 6-20 kam es in der Frühträchtigkeit wieder zu einem Anstieg der mRNA- und Proteinexpression (Rekawiecki et al., 2015). Im zyklischen Endometrium des Rindes waren die PGRs in den Zellkernen des Stromas, des Oberflächenepithels und der Epithelzellen der Uterindrüsen sowie vereinzelt in den glatten Muskelzellen von Arterien lokalisiert. Während die Proteinkonzentration der PGRs in den Zellen des Oberflächen- und des Drüsenepithels an den Tagen 1-8 des Zyklus anstieg, danach wieder abfiel und an den Tagen 15 und 19 nicht mehr im Oberflächenepithel detektierbar war, konnten die PGRs in den Stromazellen durchgängig, mit einem Maximum an Tag 8 nachgewiesen werden (Boos et al., 1996). Ähnliche Beobachtungen machten auch Robinson et al. . Sie konnten die PGRs ebenfalls im Zellkern der endometrialen Stromazellen und der Epithelialzellen der Uterindrüsen mit der höchsten Konzentration an den Tagen 0-8 des Brunstzyklus nachweisen. Nach einem Abfall an den Tagen 6-8 kam es ab Zyklustag 15 zu einem erneuten Anstieg der mRNA-Konzentration von PGRs. Auch hier konnten die PGRs in den Zellen des Oberflächenepithels nur an Zyklustag 6 detektiert werden (Robinson et al., 2001). Ebenfalls konnten die höchsten mRNA- und Proteinexpressionen der PGRs im bovinen Endometrium während den Tagen 1-5 und 17-20 des Östruszyklus nachgewiesen werden, während die niedrigsten Werte sich in der Mitte des Östruszyklus (Tage 6-16) und in der frühen Trächtigkeit (Wochen 3-12) zeigten (Kowalik et al., 2013b). Im Myometrium des Rindes wiesen die Proteinkonzentrationen der PGRs die höchsten Werte ebenfalls zu Beginn des Brunstzyklus an Tag 1-5 auf und blieben ab den Zyklustagen 6-21 und den ersten 12

Wochen der Trächtigkeit gleichbleibend auf einem niedrigen Level. Die mRNA-Konzentration zeigte allerdings im Vergleich zur Proteinexpression die höchsten Werte in der frühen Trächtigkeit (Slonina et al., 2012).

Schuler et al. haben die PGR-Verteilung im bovinen Plazentom von der Mitte bis zum Ende der Trächtigkeit (Schuler et al., 1999) und die Arbeitsgruppe von Boos et al. den PGR in der interplazentomären Uteruswand und im Plazentom während der gesamten Trächtigkeit und unter der Geburt untersucht (Boos et al., 2000; Boos et al., 2006). Beide Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die PGRs hauptsächlich in den maternalen Stromazellen des Plazentoms lokalisiert und gegen Ende der Trächtigkeit auch in den glatten Muskelzellen der Arterien zu finden sind (Schuler et al., 1999; Boos et al., 2000). In der Uteruswand zeigte sich der PGR während der Trächtigkeit relativ konstant im maternalen Stroma und Myometrium, wohingegen die Uterindrüsen nur in den ersten Trächtigkeitsmonaten PGR-positiv waren (Boos et al., 2006). Im Verhältnis zum Östruszyklus konnte eine Steigerung der mRNA-Expression des PGR in der Gravidität nachgewiesen werden, jedoch keine Schwankungen innerhalb des ersten Trimesters der Trächtigkeit (Slonina et al., 2012; Kowalik et al., 2013b).

4.4.2 PGRMC1

4.4.2.1 Entdeckung und Struktur der PGRMC1

PGRMC1 ist ein 25-28 kDa kleines multifunktionelles Protein (siehe Übersicht Cahill, 2007) mit einer Länge von 194 Aminosäuren (Falkenstein et al., 1996). Es besitzt eine einzelne, im N-Terminus lokalisierte Transmembrandomäne sowie im zytoplasmatischen C-terminus eine dem Cytochrom b5-Protein homologe Bindungsdomäne für Häm (Mifsud and Bateman, 2002; Min et al., 2004). Zusätzlich wurden weitere Bindungsstellen mit Zielsequenzen für die Src-Homologie (SH)-2, SH3, die Tyrosinkinase und die Caseinkinase (CK)-2 identifiziert (Peluso et al., 2006; Cahill, 2007; Cahill et al., 2016; Cahill, 2017). Die Struktur der PGRMCs ist komplett unterschiedlich zu der des PGR und dem G-protein-gekoppelten mPR (Raza et al., 2001; Mifsud and Bateman, 2002).

Das Protein PGRMC1 wurde mehr oder weniger gleichzeitig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen in der Leber von Ratten (Selmin et al., 1996) und Schweinen (Meyer et al., 1996) im Jahre 1996 identifiziert (siehe Übersicht Cahill et al., 2016). Selmin et al. nannten dieses 25kDa grosse Protein 25-Dx, da es aus Ratten stammte, die mit Dioxin behandelt wurden (Selmin et al., 1996; Cahill, 2007). In den folgenden Jahren beschrieben mehrere Forschergruppen das Vorkommen des PGRMC1-Proteins in unterschiedlichen Geweben von

Menschen und Säugetieren, wodurch es mit einer Reihe unterschiedlicher Bezeichnungen belegt wurde, die in der älteren Literatur zu finden sind (siehe Übersicht Cahill, 2007). Falkenstein et al. gaben 2001 dem Protein den Namen mPR für Membran-Progesteronrezeptor, nicht zu verwechseln mit den heutigen Membran-Progestinrezeptoren (mPR) (Falkenstein et al., 1996). Im Jahre 1998 wurde PGRMC1 beim Menschen identifiziert und Häm-Progesteron-Rezeptor 6.6 (Hpr6.6 oder später Hpr6) genannt (Gerdes et al., 1998). Bei der Ratte wurde PGRMC1 1999 im zentralen Nervensystem unter dem Namen Vema (Ventral Midline Antigen) (Runko et al., 1999), im Jahre 2000 in den Membranen der Leberzellen als Ratp28 (Raza et al., 2001) sowie 2001 als das Inner Zone Antigen (IZA) in Zellen der Nebennierenrinde identifiziert (Nolte et al., 2000). Zusätzlich wurden PGRMC1-Homologe bei niederen eukaryontischen Organismen, wie 2003 in Hefen, das Damage-Associated-Response-Protein (DAP1) (Hand and Craven, 2003) und 2004 das Vem-1 bei Nematoden (Runko and Kaprielian, 2004) beschrieben.

4.4.2.2 Vorkommen und Lokalisation von PGRMC1

PGRMC1 zeigt eine Vielzahl zellulärer Lokalisationen, welche zumeist zwischen verschiedenen Gewebearten variieren. In Spontaneously Immortalized Granulosa Cells (SIGCs) konnte PGRMC1 auf der extrazellulären Oberfläche der Plasmamembran lokalisiert werden (Peluso et al., 2006), wohingegen sich die Lokalisation im Uterus und in der Plazenta von Mensch und Maus in der Nähe der Zellmembran oder im Zytosol befand (Zhang et al., 2008). Des Weiteren kommt PGRMC1 in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi-Apparats (Falkenstein et al., 1996; Meyer et al., 1996; Selmin et al., 1996; Nolte et al., 2000; Albrecht et al., 2012) und in der äusseren Mitochondrienmembran (Piel et al., 2016) sowie im Zellkern (Beausoleil et al., 2004) und der mitotischen Spindel (Nousiainen et al., 2006) vor.

Neben der heterogenen Lokalisation innerhalb der Zelle ist PGRMC1 in ebenso großer Varianz in den unterschiedlichsten Gewebearten diverser Spezies zu finden. PGRMC1 kommt im männlichen Genitaltrakt (Losel et al., 2004) vor und wurde im weiblichen Reproduktionstrakt von Menschen (Zhang et al., 2008; Wu et al., 2011; Feng et al., 2014), Mäusen (Zhang et al., 2008), Ratten (Peluso et al., 2006) Affen (Ace and Okulicz, 2004), Pferden (Rambags et al., 2008), Hunden (Tahir et al., 2013) und Rindern (Kowalik and Kotwica, 2008; Luciano et al., 2010; Saint-Dizier et al., 2012; Slonina et al., 2012; Kowalik et al., 2013b) während des Östruszyklus und der frühen Trächtigkeit nachgewiesen.

Zusätzlich ist PGRMC1 auch ausserhalb des Reproduktionssystems anzutreffen, vor allem im Gehirn (Krebs et al., 2000; Min et al., 2004; Intlekofer and Petersen, 2011), in der Nebennierenrinde (Raza et al., 2001) und in Geweben mit einer hohen Mitochondrienkonzentration, wie zum Beispiel der Leber (Meyer et al., 1996; Selmin et al., 1996). Auch in krankhaft veränderten Geweben ist PGRMC1 vermehrt oder vermindert vorzufinden. Neben diversen Formen von Tumoren (Crudden et al., 2005; Craven, 2008; Peluso et al., 2008; Peluso et al., 2009; Ahmed et al., 2010b; Causey et al., 2011) und der Alzheimerkrankheit (Izzo et al., 2014b) ist PGRMC1 auch im Zusammenhang mit unterschiedlichen Reproduktionskrankheiten, wie vorzeitigen Wehen (Wu et al., 2011; Feng et al., 2014), Endometriose (Bunch et al., 2014), vorzeitige Ovarialinsuffizienz (Mansouri et al., 2008) und dem Polyzystischen Ovarsyndrom (Schuster et al., 2010) nachgewiesen worden.

Mit der Expression von PGRMC1 im weiblichen Geschlechtstrakt des Rindes haben sich eine kleine Anzahl Arbeitsgruppen befasst. 2011 wurde in einer immunhistochemischen Studie das Vorkommen und die zelluläre Lokalisation von PGRMC1 im bovinen Uterus, in den Ovarien und im Eileiter während des gesamten Brunstzyklus untersucht (Luciano et al., 2011). In fast allen Zellen der untersuchten Organe war PGRMC1 präsent. Weiterhin konnte die mRNA- und Proteinexpression sowie die zelluläre Lokalisation im bovinen Ovidukt gezeigt (Saint-Dizier et al., 2012; Kowalik et al., 2016) und das Vorkommen von PGRMC1 in bovinen Oozyten bestätigt werden (Luciano et al., 2010; Aparicio et al., 2011). Des Weiteren wurde die mRNA- und die Proteinexpression von PGRMC1 im Myometrium (Slonina et al., 2012) und im Endometrium (Kowalik et al., 2013b) während des Östruszyklus und im ersten Trimester der Trächtigkeit untersucht. Hierbei konnte sowohl die mRNA als auch das Protein von PGRMC1 im Myometrium und im Endometrium während allen drei Monaten des ersten Trächtigkeitsdrittels nachgewiesen werden und es zeigte sich im Vergleich zum Östruszyklus ein signifikanter Anstieg. Allerdings gab es keine Veränderungen zwischen den ersten drei Trächtigkeitsmonaten. Eine Studie über die zelluläre Lokalisation über die gesamte Trächtigkeitsdauer im graviden Uterus des Rindes fehlt ebenso wie die vollständige Dokumentation der entsprechenden mRNA- und Proteinexpression. Auch zu dem Vorkommen von PGRMC1 im bovinen Plazentom gibt es nach Recherche der vorliegenden Literatur bis jetzt keinerlei Studien.

4.4.2.3 Funktionen von PGRMC1

Seit der Entdeckung von PGRMC1 vor über 20 Jahren existieren eine Menge belegter und ebenso viele mögliche aber noch nicht eindeutig erwiesene Funktionen, die diesem multifunktionalen Protein zugewiesen werden und in zwei sehr ausführlichen Reviews genauer betrachtet wurden (Cahill, 2007; Cahill et al., 2016). Für die Übersichtlichkeit sind die im Weiteren besprochenen Funktionen in der Abbildung 8 schematisch dargestellt.

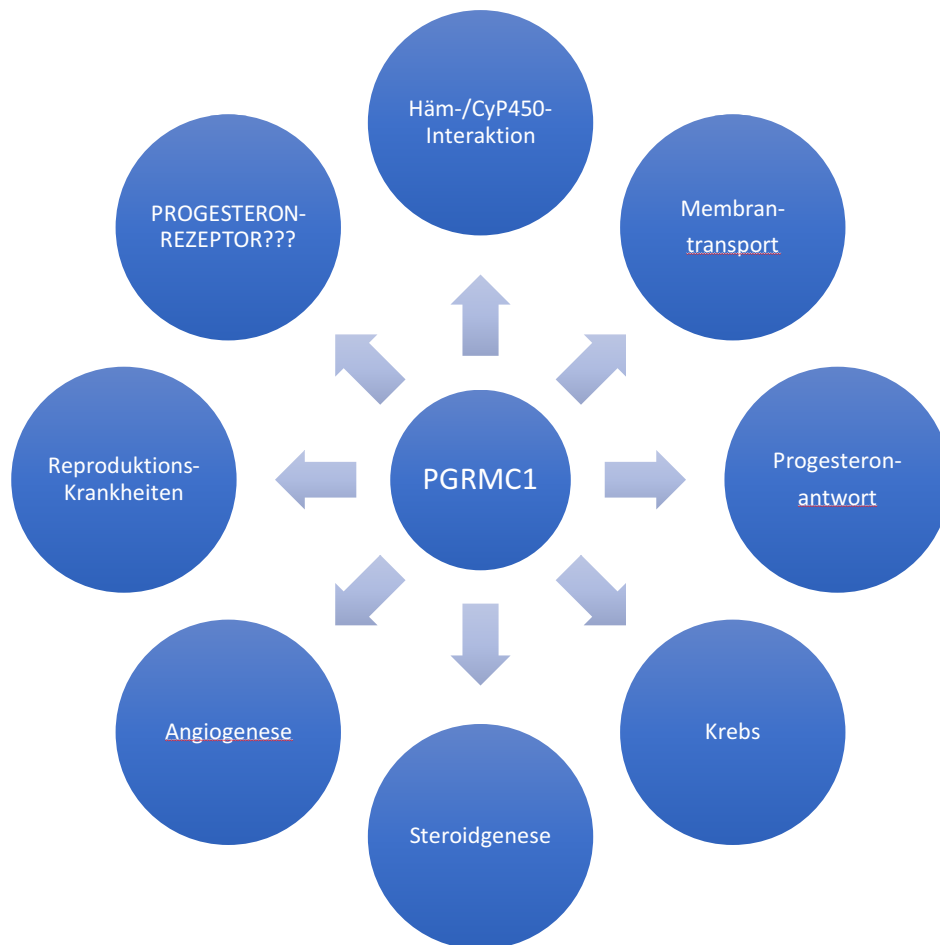


Abbildung 8: Mögliche Funktionen des PGRMC1, modifiziert nach Cahill et al. (Cahill et al., 2016)

4.4.2.3.1 Interaktion mit Häm

Ein wichtiger Interaktionspartner von PGRMC1 ist das Häm, welches an einer Bindungsstelle innerhalb der Cytochrom b5 (Cytb5)-Domäne binden kann (siehe Übersicht Cahill, 2007). Dies wurde durch spektroskopische Studien belegt (Min et al., 2004). Zusätzlich nimmt PGRMC1 auch am Eisenstoffwechsel teil, indem es mit dem letzten Enzym im Rahmen der Häm-Synthese, der Ferrochelatase (FECH), interagiert (Piel et al., 2016). Neben der Hämbindung innerhalb der Cytb5-Domäne, kann diese auch direkt mit verschiedenen

Cytochrom P450 (CyP450)-Enzymen, den so genannten Häm-abhängigen Monooxygenasen (Stryer and Stoll, 1996), in Verbindung treten. So ist PGRMC1 zum Beispiel in der Lage die Aktivität von CyP51A1 einem CyP450-Enzym, welches an der Cholesterin-Synthese teilnimmt (Hughes et al., 2007) oder dem CyP3A4, einem Arzneimittel-metabolisierenden Enzym, zu beeinflussen (Kaluka et al., 2015).

4.4.2.3.2 Steroidgenese

Neben der Beeinflussung und Interaktion mit verschiedenen CyP450-Enzymen, ist PGRMC1 Teil eines Proteinkomplexes innerhalb des ER, der an der Steroidsynthese beteiligt ist (siehe Übersicht Suchanek et al., 2005; Cahill, 2017). Dieser Proteinkomplex besteht aus dem Sterol-Regulatory-Element-Binding-Protein (SREBP), dem SREBP-Cleavage-Activating-Protein (SCAP), dem Insulin-Induced-Gene-1 (Insig-1) und der PGRMC1, welche mit Insig-1 und SCAP interagieren kann. Dies konnte in Cos-7-Zellen anhand fotoreaktiver Aminosäuren gezeigt werden (Suchanek et al., 2005). Der Insig-1/SCAP/SREBP/PGRMC1-Komplex kann über das SREB-1-Protein die Fettsäure-Lipogenese und über das SREB-2-Protein die Cholesterinbiosynthese regulieren. SREBP-2 kann die Effektivität des Mevalonatweges und damit die Produktion von Isoprenoiden steigern, welche Ausgangsstoffe für die Cholesterinbiosynthese sind (Shao and Espenshade, 2012; Cahill et al., 2016). So scheint PGRMC1 über die Interaktion mit CyP51A1 und dem Insig-1/SCAP/SREBP-Komplex an der Cholesterinbiosynthese und damit an der Steroidogenese beteiligt zu sein (Cahill et al., 2016).

4.4.2.3.3 Membrantransport

Verschiedene Studien zeigen, dass PGRMC1 in den Transport von unterschiedlichen Rezeptoren an die Zelloberfläche sowie von Vesikeln innerhalb der Zelle involviert ist (Cahill et al., 2016). 2004 haben Runko et al. verschiedene YXX (Φ)-Motive (Φ steht für eine aliphatische Aminosäure) in der Gen-Sequenz der PGRMC1 entdeckt. YXX (Φ)-Motive, welche auch als Immunreceptor-Tyrosine-Based-Activation-Motifs (ITAMS) (Li et al., 2000; Paing et al., 2004; Runko and Kaprielian, 2004) bekannt sind, scheinen am zellulären Vesikeltransport in Form von Proteintransport zur Zellüberfläche beteiligt zu sein (siehe Übersicht Cahill, 2007). Studien mit dem Molekül AG-205, welches PGRMC1 hemmt, haben gezeigt, dass durch die Inaktivierung von PGRMC1 die Lokalisation des Glucagon-Like-Peptide-1-Rezeptors (GLP-1R) (Zhang et al., 2014) und des Epidermal-Growth-Factor-Rezeptors (EGFR) (Ahmed et al., 2010a) auf der zellulären Oberfläche verhindert wurde. Zusätzlich scheint PGRMC1 über den Vesikeltransport und die Expression von Rezeptoren an

der Zelloberfläche in die pathologischen Abläufe der Alzheimerkrankheit involviert zu sein (Kayed and Lasagna-Reeves, 2013; Izzo et al., 2014a; Izzo et al., 2014b; Cahill et al., 2016).

4.4.2.3.4 Potenzieller Progesteronrezeptor

Eine der meist diskutiertesten Funktionen von PGRMC1, wie der Name vermuten lässt, ist die Bindung von Progesteron, allerdings konnte bis heute in keiner Studie die direkte Bindung dieses Hormons an PGRMC1 bewiesen werden (Cahill, 2007; Cahill et al., 2016). Vielmehr gelang es in einer Studie zu belegen, dass es nicht zu einer direkten Bindung zwischen Progesteron und dem Protein selbst kommt (Min et al., 2004). Derzeitig besteht eher die Ansicht, dass PGRMC1, anstatt selbst ein Rezeptor zu sein, als Teil eines vielschichtigen Progesteronbindungs-Komplexes fungiert (Peluso, 2006; Losel et al., 2008; Thomas, 2008; Rohe et al., 2009; Thomas et al., 2014; Wang et al., 2014; Sueldo et al., 2015). Die wichtigsten Bindungspartner im Zusammenhang mit der Vermittlung von Progesteroneffekten sind das Plasminogen-Activator-Inhibitor-mRNA-Binding-Protein-1 (PAIRBP1), auch Serpine1-mRNA-Binding-Protein (SERBP1) genannt (Peluso et al., 2005) und der mPR α (Thomas et al., 2014). Auch PGRMC2 könnte innerhalb dieses Progesteron-Rezeptor-Komplexes eine Rolle spielen. PAIRBP1 wurde zusammen mit PGRMC1 und PGRMC2 in Zellen des Ovars von Ratten nachgewiesen, wobei PGRMC1 oder PAIRBP1 eine direkte Ko-Expression und ein ähnliches zelluläres Expressionsmuster zeigten (Losel et al., 2005; Peluso et al., 2006). Auch ein PGRMC1/PGRMC2/mPR α -Komplex scheint möglich (Peluso, 2006; Thomas et al., 2014; Sueldo et al., 2015; Cahill et al., 2016).

Was jedoch bewiesen scheint, ist die Teilnahme von PGRMC1 an der Vermittlung verschiedener Effekte des Progesterons. Zum einen konnte dies durch Studien belegt werden in denen mit PGR-Knockdown-Mäusen (Lydon et al., 1995; Krebs et al., 2000; Mulac-Jericevic and Conneely, 2004) oder mit dem PGR-Antagonisten Mifepriston (Peluso et al., 2005) gearbeitet wurde. Zum anderen konnten Progesteroneffekte an Zellen beobachtet werden, die PGR nicht exprimieren, wie zum Beispiel SIGCs (Peluso et al., 2006). Peluso et al. haben 2006 in ihrer Studie am Ovar der Ratte gezeigt, dass PGRMC1 eine essentielle Rolle bei der Vermittlung des antiapoptotischen Effekts von Progesteron auf Granulosa- und Luteinzellen spielt. Auch konnte nachgewiesen werden, dass PGRMC1 in die durch Progesteron induzierte Akrosomenreaktion der Spermien involviert ist (Losel et al., 2005). Bei der durch Progesteron induzierten Ruhigstellung des Myometriums während der Gravidität scheint PGRMC1 eine tragende Rolle zu spielen. Wenn dieses Protein eine verminderte Expression im humanen Myometrium zeigt, kann Letzteres mit Kontraktionen

reagieren, was sich in vorzeitigen Wehen äußern kann (Wu et al., 2011). Es besteht also kein Zweifel, dass PGRMC1 in manchen Geweben von Nöten ist, damit sich die biologische Wirkung von Progesteron vollständig entfalten kann. Einzig und allein bleibt die Frage zu klären, ob PGRMC1 diese Effekte als selbstständiger Progesteronrezeptor oder indirekt als Adapterprotein, das für die Lokalisation anderer Progesteronrezeptoren an der Zelloberfläche verantwortlich ist, vermittelt.

4.4.2.3.5 Tumorerkrankungen

PGRMC1 ist in vielen Tumoren in höherer Konzentration als in vergleichbaren gesunden Geweben vorhanden (siehe Übersicht Cahill, 2007; Losel et al., 2008). Neben Brust-, Eierstocks-, und Gebärmutterhalskrebs war PGRMC1 auch in Lungen-, Schilddrüsen- und Darmtumoren exprimiert (Crudden et al., 2005; Selmin et al., 2005; Peluso, 2007; Craven, 2008; Peluso et al., 2009; Ahmed et al., 2010a; Ahmed et al., 2010b; Causey et al., 2011; Peluso, 2011; Albrecht et al., 2012; Hampton et al., 2015). Die Bedeutung von PGRMC1 in der Tumorpathologie liegt darin begründet, dass PGRMC1 die Entwicklung von Neoplasien auf unterschiedliche Art und Weise fördert (siehe Übersicht Cahill et al., 2016). Zum Beispiel kann es die Resistenz der Krebszellen gegenüber dem apoptotischen Effekt bestimmter Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Doxorubicin und Campothecin stärken (Crudden et al., 2006; Peluso et al., 2008). Ferner ist PGRMC1 möglicherweise in die durch den Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) induzierte Neovaskularisation in tumorösem Gewebe sowie die gesteigerte Proliferation in Brustkrebsgewebe involviert (Neubauer et al., 2009). Zusätzlich beschreiben einige Autoren die Bindung von PGRMC1 an den EGF-Rezeptor, welchem eine bedeutende Rolle bei der Signalweiterleitung innerhalb von entarteten Zellen zukommt, was in einer Stimulation des Zellwachstums und einer Verhinderung der Apoptose mündet (Morandell et al., 2008; Hampton et al., 2015; Kabe et al., 2016). Alles in allem zeigen diese Studien, dass PGRMC1 die Entwicklung und Expansion von Neoplasien eindeutig fördert. Durch die erhöhte Expression von PGRMC1 in Tumorgewebe könnte dieser eventuell als Biomarker für verschiedene Krebsarten oder als Ziel neuer Medikamente für die Krebstherapie dienlich sein (Cahill, 2007; Craven, 2008; Losel et al., 2008; Causey et al., 2011).

4.4.3 PGRMC2

4.4.3.1 Entdeckung und Struktur von PGRMC2

Im Gegensatz zu dem sehr gut erforschten PGRMC1 sieht die Datenlage für das engverwandte PGRMC2 nicht ganz so üppig aus (siehe Übersicht Wendler and Wehling, 2013). PGRMC2 gehört ebenfalls der MAPR-Familie an und besitzt, wie alle Mitglieder dieser Familie, eine dem Cytochrom b5-Protein homologe Bindungsdomäne für Häm (Mifsud and Bateman, 2002; Min et al., 2004). Es ist ähnlich dem PGRMC1 aus einem N-terminus, einer einzelnen Transmembrandomäne und einem im Zytoplasma liegenden C-Terminus aufgebaut, wobei sich aber die Sequenz des N-Terminus und der Transmembrandomäne der beiden Proteine unterscheidet. Außerdem ist das PGRMC1-Gen auf dem X-Chromosom und das PGRMC2-Gen auf dem vierten Chromosom lokalisiert (Wendler and Wehling, 2013). Innerhalb des C-Terminus in der Cytb5-Domäne gelegen, lassen sich bei PGRMC2 mögliche Bindungsstellen für die Extracellular-Signal-Regulated-Kinase (ERK), die Lck/Abl-Tyrosinkinase und eine SH2-Zielsequenz finden (siehe Übersicht Cahill, 2007).

PGRMC2 wurde 1998 unter dem Namen Dg6 zusammen mit dem Gen für PGRMC1 als HPR6.6 beziehungsweise HPR6 beim Menschen von Gerdes et al. identifiziert (Gerdes et al., 1998; Cahill, 2007; Wendler and Wehling, 2013). Weiterhin wurde PGRMC2 2004 von Runko et al. bei Menschen, Mäusen und Fischen identifiziert und VemaB genannt (Runko and Kaprielian, 2004; Cahill, 2007). Zusätzlich wurde PGRMC2 im Jahre 2005 von einer weiteren Arbeitsgruppe als humanes Inner Zone Antigen 2 (hIZA2) beschrieben (Min et al., 2005; Cahill, 2007).

4.4.3.2 Lokalisation und Vorkommen von PGRMC2

PGRMC2 zeigt eine ähnliche zelluläre Lokalisation wie PGRMC1. Auch hier scheint es von der Gewebeart und von dessen Zustand abhängig zu sein, wo PGRMC2 in einer Zelle lokalisiert ist (Keator et al., 2012). PGRMC2 wurde hauptsächlich im ER und im Zytoplasma detektiert (Albrecht et al., 2012; Keator et al., 2012; Wendler and Wehling, 2013). Es zeigte sich im Endometrium von Makaken, dass sich bei Tieren mit einer Endometriose die zelluläre Lokalisation vom Zytoplasma in den Zellkern verlagerte (Keator et al., 2012; Wendler and Wehling, 2013).

PGRMC2 wurde bis jetzt bei Menschen (Gerdes et al., 1998), Zebrafischen (Runko and Kaprielian, 2002) und verschiedenen Säugetieren nachgewiesen: bei Schweinen (Chen et al., 2010), Ratten (Nilsson et al., 2006; Intlekofer and Petersen, 2011; Griffin et al., 2014), Mäusen (Zhang et al., 2008), Affen (Keator et al., 2012), Hunden (Tahir et al., 2013) und Rindern (Aparicio et al., 2011; Saint-Dizier et al., 2012; Kowalik et al., 2014). Dabei konnte

es in Organsystemen, wie dem männlichen (Losel et al., 2005) und weiblichen Reproduktionstrakt (Zhang et al., 2008; Keator et al., 2012; Tahir et al., 2013; Bunch et al., 2014; Griffin et al., 2014; Kowalik et al., 2014; Sueldo et al., 2015), dem Gehirn (Intlekofer and Petersen, 2011) und der Leber (Chen et al., 2010) identifiziert werden.

Mit dem Vorkommen von PGRMC2 beim Rind haben sich bislang vier Arbeitsgruppen beschäftigt. Aparicio et al. wiesen 2011 PGRMC2 im Zytoplasma von bovinen Cumuluszellen nach (Aparicio et al., 2011). Saint-Dizier et al. haben 2012 zum ersten Mal PGRMC2 im bovinen Eileiter während des Brunstzyklus und der Gravidität nachgewiesen. Dabei war es im Zellkern und im Zytoplasma des Oberflächenepithels, des Stromas und der Muskelschicht anzutreffen (Saint-Dizier et al., 2012). Auch die Gruppe von Kowalik et al. hat 2015 neben der mRNA- und Proteinexpression, die zelluläre Lokalisation von PRGMC2 im bovinen Ovidukt während des Zyklus untersucht. Sie konnten ebenfalls PGRMC2 in den gleichen Lokalisationen wie Sait-Dizier et al. und zusätzlich im Endothel von Blutgefäßen nachweisen (Kowalik et al., 2016). Weiterhin haben diese Autoren PGRMC2 im Gelbkörper (Kowalik et al., 2014) und im Endometrium (Kowalik et al., 2013b) gravider (erstes Trimester) und zyklischer Rinder untersucht. Takashi et al. untersuchten ebenfalls die mRNA-Expression von PGRMC2 innerhalb des Endometriums beider Uterushörner während der Lutealphase des Östruszyklus (Takahashi et al., 2016). Im Corpus luteum präsentierte sich PGRMC2 in den kleinen und großen Luteinzellen sowie in den Endothelzellen der Blutgefäße. Es war in der Lutealphase des Zyklus und während der ersten 12 Wochen der Trächtigkeit gegenüber der Follikelphase erhöht (Kowalik et al., 2014). Im Endometrium war PGRMC2 während aller untersuchten Stadien vorhanden, wobei die mRNA-Expression während des Zyklus nicht variierte, dafür aber bei den trächtigen Tieren im Vergleich zu den zyklischen anstieg (Kowalik et al., 2013b) .

Untersuchungen zum Vorkommen von PGRMC2 in bovinen Plazentomen existieren noch nicht, aber zwei Forschungsgruppen haben die Existenz von PGRMC2 in der humanen Plazenta untersucht. Gerdes et al. konnten 1998 das Gen dg6, also PGRMC2, mittels Northern Blot in der menschlichen Plazenta identifizieren (Gerdes et al., 1998). Shankar et al. haben in ihrer Studie die menschliche Plazenta mitsamt den fetalen Membranen auf molekulare Marker für Frühwehen untersucht. Dabei stellten sie fest, dass unter anderem die Expression von PGRMC2 sowohl während der physiologischen als auch der vorzeitigen Wehen erhöht war (Shankar et al., 2010).

4.4.3 Funktionen von PGRMC2

4.4.3.1 Bindungspartner

Da generell nur eine sehr begrenzte Anzahl an Studien über PGRMC2 existieren, ist auch relativ wenig über dessen Bindungspartner bekannt. Die Tatsache, dass es wie PGRMC1 eine Hämbindungsdomäne besitzt, macht die Interaktion mit Häm relativ wahrscheinlich (Wendler and Wehling, 2013). Außerdem tritt PGRMC2, ähnlich wie PGRMC1, mit einigen CytP450-Enzymen in Kontakt. Es geht mit CyP21A2 und CyP3A4 eine stabile Bindung ein (Albrecht et al., 2012). Weitere Studien sind auf jeden Fall von Nöten, um die genauen Bindungs- und Interaktionspartner von PGRMC2 zu identifizieren.

4.4.3.2 Tumorerkrankungen

Ähnlich wie PGRMC1 scheint auch PGRMC2 eine Rolle in der Tumorphathologie zu spielen. Mit der Funktion und dem Vorkommen von PGRMC2 in Neoplasien haben sich drei verschiedene Gruppen beschäftigt. Alle zeigten, dass PGRMC2, im Gegensatz zu PGRMC1, eine negative Wirkung auf die Tumorentwicklung hat (Wendler and Wehling, 2013). In den Untersuchungen über die Genexpression in Metastasen des endozervikalen Adenokarzinoms der Gebärmutter konnte eine starke Verringerung des PGRMC2-Levels in den Metastasen nachgewiesen werden. Daraus wurde gefolgert, dass PGRMC2 suppressiv auf tumoröses Gewebe einwirkt (Hirai et al., 2004; Wendler and Wehling, 2013). Zusätzlich wurde bei der Untersuchung an ovariellen Krebszellen (SKOV-3) herausgefunden, dass bei einer erhöhten PGRMC2-Expression die Migrationsrate der Krebszellen zurückging und anstieg sobald das PGRMC2-Level sank (Albrecht et al., 2012; Wendler and Wehling, 2013). Durch die Entdeckung, dass die mRNA-Expression von PGRMC2 innerhalb von Adenokarzinomen der Brust im Tumorstadium II signifikant geringer war als im Stadium III, könnte PGRMC2 eventuell ein Biomarker für Krebsstadien sein (Causey et al., 2011).

4.4.3.3 Reproduktionsgeschehen

PGRMC2 scheint ebenso wie PGRMC1 sehr wichtig für die Physiologie der weiblichen Reproduktion zu sein. Dies wird besonders deutlich, wenn bei Abwesenheit oder verändertem Expressionsmuster einer oder beider Proteine, pathologische Veränderungen auftreten (Pru and Clark, 2013). Bei Frauen mit vorzeitigen als auch zeitgerechten Wehen zeigte sich, im Gegensatz zu PGRMC1, ein signifikanter Anstieg von PGRMC2 in der Dezidua und im Chorion (Shankar et al., 2010; Wendler and Wehling, 2013). PGRMC1 hingegen wies eine verminderte Expression bei Frauen mit vorzeitigen Wehen auf (Wu et al., 2011). Dieses

veränderte und gegenläufige Verhalten von PGRMC1 und PGRMC2 lässt vermuten, dass beide eventuell auf unterschiedliche Art und Weise an der Pathologie beziehungsweise Physiologie der Geburt und deren Einleitung beteiligt sein könnten (Pru and Clark, 2013; Wendler and Wehling, 2013).

Des Weiteren konnte eine gesteigerte Expression von PGRMC2 bei Makaken und Frauen mit einer Endometriose nachgewiesen werden (Keator et al., 2012; Bunch et al., 2014).

4.4.4 mPR α , β und γ

Membran Progesterin Rezeptoren (mPR) stellen weitere Kandidaten dar, welche die schnellen, nicht-genomischen Progesteroneffekte vermitteln können und nicht mit dem PGR verwandt sind (siehe Übersicht Gellersen et al., 2009). Sie gehören zu der Familie der Progesterin- und AdipoQ -Rezeptoren (PAQR) (Tang et al., 2005; Thomas et al., 2007). Entdeckt wurden die mPRs zuerst von Zhu et al. 2003 in Fischoozyten und kurz darauf konnten sie auch in menschlichem Gewebe identifiziert werden (Zhu et al., 2003a; Zhu et al., 2003b). Es existieren drei wichtige Isoformen, mPR α (PAQR7), mPR β (PAQR8) und mPR γ (PAQR5) (siehe Übersichten Gellersen et al., 2009; Kowalik et al., 2013a), die jeweils eine 7-Transmembrandomäne besitzen, welche typisch für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ist. Sie haben eine Länge von 352 Aminosäuren, besitzen ein Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa (Zhu et al., 2003b) und zeigen eine hohe Bindungsaffinität ($K_d \approx 5\text{nM}$) zu Progesterin (Thomas et al., 2007; Thomas and Pang, 2012, 2013). Die einzelnen Isoformen zeigen jeweils bestimmte Gewebespezialisierungen. So kommt mPR α hauptsächlich im Reproduktionstrakt vor, mPR β im Nervensystem, und mPR γ lässt sich am häufigsten im Gastrointestinaltrakt antreffen (Zhu et al., 2003a; Cai and Stocco, 2005; Kowalik et al., 2013a). Zellulär sind diese Rezeptorformen in den Zellmembranen oder den Membranen des ER vertreten (Zhu et al., 2003b; Kowalik et al., 2013a). Seit ihrer Entdeckung wurden die mPRs in den Organen unterschiedlichster Säugetiere nachgewiesen (Dressing et al., 2011). Neben dem Menschen (Zhu et al., 2003b; Thomas et al., 2007) und bei den Fischen (Zhu et al., 2003b) kommen sie im Schaf (Ashley et al., 2006), Schwein (Qiu et al., 2008), in der Maus (Nutu et al., 2007; Nutu et al., 2009), in der Ratte (Cai and Stocco, 2005; Selmin et al., 2005), im Hund (Tahir et al., 2013), im Pferd (Rambags et al., 2008) und im Rind (Kowalik et al., 2016; Takahashi et al., 2016) vor. Eine schnelle biologische Antwort auf die Bindung von Progesteron scheinen sie durch verschiedene Second-Messenger-Systeme zu realisieren (Kowalik et al., 2013a). Durch die Bindung von Progesteron an mPR kommt es zu einer gesteigerten Aktivität der von

cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP)-abhängigen Mitogen-Activated-Protein (MAP)-Kinase (Zhu et al., 2003b; Karteris et al., 2006; Peluso et al., 2006). Ausserdem können sie den verfügbaren intrazellulären Kalziumgehalt erhöhen, indem sie die Phospholipase C aktivieren (Ashley et al., 2006). Eine der wichtigsten Funktionen dieser Rezeptorgruppe ist also ohne Zweifel die Vermittlung von Progesteroneffekten (Thomas and Pang, 2012, 2013). Bewiesen ist, dass sie eindeutig in die durch Progesteron stimulierte Oozytenreifung involviert sind (Zhu et al., 2003b; Tokumoto et al., 2016). Des Weiteren vermittelt mPR α die progesteronabhängige Beweglichkeit der Spermien von Mensch und Fisch (Thomas et al., 2007; Tubbs and Thomas, 2009) und zusammen mit mPR β ist er wichtig für das durch Progesteron ausgelöste Sexualverhalten von Mäusen und Ratten (Frye et al., 2013; Frye et al., 2014). Außerdem scheinen auch beide eine Rolle bei Neoplasien zu spielen, da sie eine hohe Expression in Eierstocks- und Mammatumoren zeigen (Charles et al., 2010; Dressing et al., 2012).

4.4 Ziel des Projekts

Aufgrund der fehlenden, beziehungsweise unvollständigen Datenlage zum Vorkommen und zur zellulären Lokalisation von PGRMC1 und PGRMC2 in der bovinen Plazenta und der interplazentomären Uteruswand während der gesamten Trächtigkeit, soll diese Studie eine Basis bilden für das Verständnis, welche Rolle diese beiden potenziellen Progesteronrezeptoren während des Graviditätsverlaufs beim Rind spielen. Hierfür soll mit modernen Methoden ein lückenloses Bild von der mRNA- und Proteinexpression sowie der zellulären Lokalisation dieser beiden potenziellen Rezeptoren innerhalb des bovinen Uterus und der Plazenta in allen Phasen der Trächtigkeit geschaffen werden.

5 Material und Methoden

5.1 Probengewinnung

Für diese Studie wurden Gewebeproben der interplazentomären Uteruswand und der Plazenta von 45 trächtigen Schlachtrindern in verschiedenen Stadien der Gravidität entnommen.

5.1.1 Schlachttiere und Probenentnahme

Sämtliche Proben der Schlachttiere stammen aus dem SBZ Schlachtbetrieb Zürich AG in 8048 Zürich, Schweiz und wurden dort gesammelt. Die Betäubung der Rinder fand durch die Verwendung eines Bolzenschussgerätes statt. Ungefähr 20 Sekunden nach der Betäubung wurde der Tötungsprozess mittels Blutentzug vollzogen. Gefolgt von der Enthäutung und Eviszeration der Tiere, konnten zwischen 20 und 30 Minuten nach Eintritt des Todes, die Gewebeproben direkt am Schlachtband entnommen und aufarbeitet werden. Es wurden pro Trächtigkeitsmonat (1.–9. Monat) Gewebeproben von je 5 Schlachttieren ($n = 5$ Tiere/Trächtigkeitsmonat) gesammelt. Wie bereits früher beschrieben (Boos et al., 2000), wurden nach der Eröffnung des trächtigen Uterus, je ein zufällig ausgewähltes Plazentom und ein Stück der interplazentären Uteruswand aus der Mitte des tragenden Uterushorns entnommen.

5.1.1.1 Bestimmung des Trächtigkeitsalters

Um den jeweiligen Trächtigkeitsmonat der verwendeten Schlachttiere zu ermitteln, wurden die Embryonen beziehungsweise Feten aus dem Uterus entwickelt und deren Scheitel-Steiß-Länge (SSL) in cm gemessen. Anhand der SSL und der Verwendung der Formel nach Keller (A) wurde das ungefähre Trächtigkeitsalter ermittelt (Schnorr and Kressin, 2011) .

$$(A) \quad x = \sqrt{y + 1} - 1$$

x = Anzahl der Entwicklungsmonate (Monat = 28 Tage = 4 Wochen)

y = Scheitel-Steiß-Länge in cm

5.1.2 Probenaufarbeitung

Die entnommenen Gewebeproben wurden wie folgt mit dem Skalpell unterteilt:

Die Uteruswand wurde in drei Stücke, a 10 x 10 mm, zugeschnitten und aus dem Plazentom wurden drei zentral lokalisierte, ungefähr 5 mm breite Querschnitte entnommen (Boos et al.,

2000). Für die geplanten Untersuchungen wurden die Gewebeproben weiterverarbeitet, wie nachfolgend beschrieben.

5.1.2.1 Gewebevorbereitung für die RNA-Extraktion

Für die Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA) wurde je ein Stück der Uteruswand und des Plazentoms für 24 Stunden in RNAlater® (Ambion Biotechnologie GmbH, Wiesbaden, Deutschland) bei +4°C gelagert. Das Mischverhältnis Masse:Volumen betrug 1:6. Anschließend wurde das RNAlater® abgegossen, die Gewebestücke in Alufolie eingewickelt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert (Kowalewski et al., 2006).

5.1.2.2 Gewebevorbereitung für die Immunhistochemie

Zur späteren Verwendung für die Immunhistochemie wurde je ein Stück der Uteruswand und des Plazentoms, wie bereits früher beschrieben (Boos et al., 2000) für 24 Stunden in 4%igem, neutral gepuffertem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Proben in speziellen Einbettkassetten (Bio-optica Kassetten®, P.H. Stehelin & CIE AG, Basel, Schweiz) 24 Stunden lang unter fließendem Leitungswasser gewaschen und für weitere 24 Stunden in 70%igem Alkohol gelagert. Mithilfe eines Gewebeinfiltrationsautomaten (TP1020®, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) wurden die Gewebeproben dann, gemäß Tabelle 1, in einer aufsteigenden Alkoholreihe über Methylbenzoat und Xylol dehydriert und mit Paraffin (Paraplast Plus®, Sheerwood, Medical, St Louis, MO, USA) infiltriert. Die Einbettung der infiltrierten Proben in Paraffinblöcke wurde anschließend mithilfe der Paraffinausgießstation (EG1160®, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) realisiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Paraffinblöcke bei +4°C gelagert.

Tabelle 1: Protokoll für die maschinelle Dehydrierung und Paraffininfiltration der Gewebeproben mithilfe des Gewebeeinfiltrationsautomaten

<i>Dauer in Stunden</i>	<i>verwendetes Medium</i>
4	70% Alkohol
4	70% Alkohol
4	96% Alkohol
4	96% Alkohol
4	100% Alkohol
4	100% Alkohol
4	Methylbenzoat
4	Methylbenzoat
4	Xylol
4	Xylol
4	Paraffin
4	Paraffin

5.1.2.3 Gewebevorbereitung für die Proteinisolierung

Für die Identifikation der Proteinexpression in den Gewebeproben wurden diese in Alufolie gewickelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschliessend wurden die Proben bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

5.2 Real Time(TaqMan)-PCR

5.2.1 RNA-Isolierung

Um die Gesamt-RNA aus den vorhandenen Proben (n= 5 Tiere/Trächtigkeitsmonat) zu isolieren, wurde zuerst mit einer physikalischen Zerkleinerung des Gewebes begonnen. Hierzu wurde das bei -80°C eingelagerte, gefrorene und in Alufolie eingewickelte Gewebe, mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebesplitter aus der Alufolie entnommen und in einen sterilen, gekühlten Mörser überführt, in dem sie unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mithilfe eines sterilen Pistills zu Pulver verarbeitet wurden (Müller, 2010). Nach dem bereits etablierten Verfahren (Kowalewski et al., 2006) wurde nun das Gewebepulver in einem 2 ml fassenden Eppendorf-Reaktionsgefäss mit je 1 ml Trizol®-

Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) versetzt. Gelöst im Trizol® wurde das Gewebepulver mit einem Ultra-Turrax® (Homogenisator VDI 12, VWR, Dietikon, Schweiz) bearbeitet, bis es vollständig homogenisiert war. Nach 10-minütiger Abkühlung auf Eis wurde den Proben je 200µl Chloroform (Roth GmbH & Co., Arlesheim, Schweiz) zugeführt, anschließend geschüttelt und bei 20'000g und +4°C 20 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren im Eppendorf-Reaktionsgefäß drei Phasen zu erkennen, wobei die oberste wässrige Phase die gesuchte Gesamt-RNA beinhaltete. Diese oberste Schicht wurde vorsichtig in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und der Rest verworfen. Dieser Aufreinigungsschritt mit Chloroform wurde noch einmal wiederholt. Danach wurde der RNA-enhaltende Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol (2-Propanol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz) versetzt, geschüttelt und für 30 Min bei -20°C kaltgestellt. Das Isopropanol führt zu einer Fällung der vorhandenen Nukleinsäuren. Anschließend wurden die Proben bei +4°C und 20'000g für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme und Verwurf des Überstandes, wurde dem entstandenen Pellet 800µl steriles 70%iges Ethanol (Roth GmbH & Co., Arlesheim, Schweiz) zugesetzt und anschließend noch einmal bei +4°C und 20'000g für 20 Minuten zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde wiederum abgenommen und verworfen und das verbliebene Pellet bei offenem Reaktionsgefäß und Raumtemperatur (RT) getrocknet, bis es eine weißliche Farbe annahm. Zu jeder Probe wurde anschließend 50µl autoklaviertes und destilliertes Wasser hinzugegeben und dann bei +50°C und 700 Rotationen pro Minute (rpm) für 10 Minuten in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Vaudaux-Eppendorf Ag, Basel, Schweiz) erhitzt. Um die isolierte RNA vor enzymatischem Abbau zu schützen, wurde jeder Probe 1µl RNase-Inhibitor (RiboLock RNase Inhibitor, 40U/µl, Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, Schweiz) zugesetzt. Die Bestimmung der vorhandenen Gesamt-RNA-Konzentration in den Proben wurde durch eine photometrische Dichtebestimmung mithilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop® 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) durchgeführt.

5.2.2 DNase-Behandlung

Um die RNA von eventuellen restlichen genomischen Desoxyribonukleinsäure(DNA)-Bestandteilen zu reinigen, wurde den Proben das Enzym Desoxyribonuklease (DNase) zugesetzt. Die DNase katalysiert die noch vorhandene DNA und somit kann deren Amplifikation in einer ablaufenden RealTime-PCR und dem damit einhergehenden

falschpositiven Ergebnis verhindert werden. In dieser Studie wurde die DNase I (DNase I, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. 3 µl DNase-Mix (siehe Tabelle 2) wurde jeweils mit 7 µl RNA-Arbeitslösung (RNA 100-200 ng/µl) bei RT inkubiert. Nach 15 Minuten wurde je Probe 1 µl DNase-Stopp-Solution dazugegeben um die Enzymaktivität der DNase zu unterbinden. Danach folgte ein 10-minütiger Aufenthalt in einem Thermocycler bei +70°C, welchem sich direkt der Prozess der reversen Transkription (siehe 5.2.3) anschloss.

Tabelle 2: Zusammensetzung des DNase-Mix

Komponenten	einfacher Ansatz (µl)
10 x Reaktions-Puffer	1
DNase I (1 U/µl)	1
steriles bidest. Wasser	1
Gesamtvolumen	3

5.2.3 Reverse Transkription

Für das Verfahren der RealTime-PCR wird, anstatt der vorhandenen RNA die dazugehörige komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) benötigt. Hierzu setzt man spezielle Enzyme, sogenannte reverse Transkriptasen ein, die sich an RNA-Einzelstränge setzen und einen dazu komplementären DNA-Strang bilden. Anschließend kann ein DNA-Doppelstrang synthetisiert werden. Die Synthese der cDNA aus der bereits isolierten RNA wurde mithilfe des DyNAmo cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Wilmimngton, DE, USA) durchgeführt. Hierzu wurde 7 µl der mit DNase behandelten RNA-Arbeitslösung in ein 20 µl großes Gesamtreaktionsvolumen pipettiert. Der verwendete DyNAmo cDNase Synthesis Kit wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers pipettiert (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung des DyNAmo cDNA Synthesis Kit

Komponenten	einfacher Ansatz (µl)
M-MuLV RNase H+ reverse Transkriptase, inklusive RNase-Inhibitor	2
2x RT-Puffer (beinhaltet dNTP mix und 10mM MgCl₂)	10,5
Random Hexamers (300ng/µl)	0.5
Gesamtvolumen	13

Die Prozedur der reversen Transkription wurde in einem Thermocycler (SensoQuest Labcycler, SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland) unter in Tabelle 4 aufgeführten Bedingungen vollführt.

Tabelle 4: Reaktionsbedingungen der reversen Transkription

Phasen	Reaktionsbedingungen
1. Primer Anlagerung	+25°C, 10 Minuten
2. cDNA-Synthese	+37°C, 30 Minuten
3. Stoppreaktion	+85°C, 5 Minuten
4. Abkühlen der Proben	+4°C

Bis zur weiteren Verwendung wurde die synthetisierte cDNA bei -20°C gelagert.

5.2.4 Semi-quantitative RealTime(TaqMan)-PCR

5.2.4.1 Prinzip

Die seit 1985 (Saiki et al., 1985; Mülhardt, 2006) bekannte, klassische Polymerase-Kettenreaktion, englisch: Polymerase Chain Reaction (PCR), ist eine der meistgenutzten Technologien in der heutigen Molekularbiologie (Mülhardt, 2006). Sie wird benutzt um DNA, beziehungsweise bestimmte Abschnitte der DNA (Templates), zu vervielfältigen. So kann die gesuchte DNA, beziehungsweise das Template, in einem nachfolgenden Prozess, zum Beispiel durch Verwendung einer Gelelektrophorese, qualitativ nachgewiesen werden. Mithilfe der weiterentwickelten quantitativen RealTime-PCR kann, wie der Name schon sagt, nicht nur ein qualitativer, sondern auch ein quantitativer Nachweis der Genexpression in Echtzeit durchgeführt werden. Wie bei der klassischen PCR, werden auch bei dieser Methode

zuerst durch Erhitzung die DNA-Doppelstränge denaturiert, sodass nur noch DNA-Einzelstränge vorliegen. Im Anschluss erfolgt die Primerhybridisierung, wobei sich die Primer je an das 3'-Ende der DNA-Einzelstränge anlagern um den Startpunkt für die DNA-Polymerase zu markieren. Diese kann dann in der sogenannten Elongations-Phase, Verlängerungs-Phase, den Primer verlängern bis wieder ein neuer DNA-Doppelstrang vorliegt (Mülhardt, 2006). Zusätzlich zu den Primern wird jedoch bei der quantitativen Methode ein kurzes, zum Beispiel mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) markiertes Oligonucleotid zugefügt, dessen 3'-Ende blockiert ist, damit es nicht als Primer arbeiten kann. Es lagert sich zwischen den Primern an den DNA-Einzelstrang an. Wenn die Polymerase bei der DNA-Synthese nun auf dieses Oligonukleotid trifft, wird es dank der Exonuklease-Aktivität dieses Enzyms abgebaut und das Fluorochrom freigesetzt, welches dann detektiert werden kann (Mülhardt, 2006). Die am längsten bekannte Variante dieser Fluoreszenz-Detektion ist die TaqMan®-Methode (Livak et al., 1995; Mülhardt, 2006). Hierbei besitzt das verwendete Oligonukleotid, auch TaqMan®-Sonde genannt, am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporterfarbstoff „6-FAM“ (6-Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff „TAMRA“ (Tetramethylrhodamin). Durch die Nähe von Reporter und Quencher ist die Lichtstärke des Reporters gering, da die meiste Energie an den Quencher abgegeben wird. Wird nun diese räumliche Nähe durch die Polymerase, welche das Oligonukleotid abbaut, aufgehoben und der Reporter freigesetzt, kommt es zu einer erhöhten Lichtproduktion, einem Fluoreszenzsignal, welches detektiert werden kann. Das bedeutet also, dass die Stärke des Lichtsignals mit der Menge der freigesetzten Reporter und somit der vorhandenen DNA-Menge direkt zusammenhängt (Mülhardt, 2006). Bei der Auswertung handelt es sich allerdings nur um eine relative Quantifizierung der PCR-Produkte, indem man den C_t -Wert = Threshold Cycle als Grundlage der Berechnung nutzt. Der C_t -Wert (Schwellenwert) gibt an, nach welcher Zyklenzahl der DNA-Amplifikation das Fluoreszenzsignal eines untersuchten Gens sich erstmals deutlich vom Hintergrund differenziert. Ab dann steigt die Abgabe der Fluoreszenzsignale und damit die Amplifikation der DNA exponentiell an. Das bedeutet also, je niedriger der C_t -Wert ist, desto grösser war die Ausgangsmenge der vorhandenen DNA in der untersuchten Probe (Mülhardt, 2006).

5.2.4.2 Durchführung

Die semi-quantitative RealTime(TaqMan®)-Polymerase-Kettenreaktion wurde, wie bereits beschrieben (Kowalewski et al., 2006; Rekawiecki et al., 2014), in einem 7900 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in 384-Well-Plates unter Benutzung eines automatischen Pipettiersystems (Agilent bravo Automated Liquid Handling Platform, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), durchgeführt. Für dieses Verfahren wurde der TaqMan® Universal Mastermix II (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) eingesetzt. 3µl cDNA-Lösung (200ng cDNA) von jeder Probe wurden in einem Gesamt-Reaktionsvolumen von 10µl verwendet. Von allen Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Für die jeweils mitgeführten Negativkontrollen wurde autoklaviertes Wasser anstelle der cDNA benutzt. Die Zusammensetzung des verwendeten Reaktionsvolumens befindet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsvolumens für die RealTime(TaqMan®)-PCR

Komponenten	einfacher Ansatz (µl)
TaqMan® Universal Mastermix II	5
Sense-Primer (200nM)	0.5
Antisense-Primer (200nM)	0.5
TaqMan®-Sonde (200nM)	1
Gesamtvolumen	7

Die TaqMan®-Sonden und Primer wurden mithilfe der PrimerExpress 3.0 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) designend. Die Sequenzen und Genbank Accession-Nummern der verwendeten Gene PGRMC1 und PGRMC2 und der beiden Referenzgene, GADPH und SUZ12, sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Sequenzen der Primer und Sonden

Primer	Accession Nummer	Basensequenz	Länge	Produktlänge (bp)
PGRMC1				
-Forward:	HA09110025	CTATCCCGGCCCAACCTT	18	169
-Reverse:	HA09110026	GCACGATCTTGTAGAGCAGAAAGA	24	
-Sonde:	HA09110014	[6FAM]CAAGAGATTTTCACGTCGCCGCTCA[TAMRA]	25	
PGRMC2				
-Forward:	HA09110019	TGCCTCTTTGCCTCGTATGA	20	179
-Reverse:	HA09110020	GAGGCATCCCTACCAGCAAAT	21	
-Sonde:	HA09110011	[6FAM]TCTCGCAACCCGCGCATCC[TAMRA]	19	
GADPH				
-Forward:	HA09110029	CCTGCCCGTTCGACAGATA	19	150
-Reverse:	HA09110030	GGCGACGATGTCCACTTTG	19	
-Sonde:	HA09110016	[6FAM]TTCTGTGCTGTGCCAGCCGCA[TAMRA]	21	
SUZ12				
-Forward:	HA07203645	AAAGAAAGGATGTAAGTTGTCCGATAA	27	144
-Reverse:	HA07203646	TGGCTGTTACTAGGTTCAAATTCATT	26	
-Sonde:	HA07203640	[6FAM]AGCAGGTGCCTTTGAATCCTGACCTCA[TAMRA]	27	

Für die Negativkontrolle wurde autoklaviertes Wasser anstelle der cDNA benutzt. Die RealTime-PCR lief unter folgenden Bedingungen (siehe Tabelle 7) ab:

Tabelle 7: Reaktionsbedingungen der RealTime(TaqMan®)-PCR

Phasen	Zyklen	Reaktionsbedingungen
1. Initiale Denaturierung	1	+95°C, 10 Minuten
2. Denaturierung	40	+95°C, 15 Sekunden
3. Annealing und Verlängerung	40	+60°C, 60 Minuten

5.2.4.3 Auswertung

Die Berechnung und die graphische Darstellung der Daten wurde mit dem Programm Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) durchgeführt. Für die statistische Datenanalyse wurde das Programm GraphPad 3.06 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) verwendet (siehe 5.2.4.4).

Die Analyse der Daten wurde durch die relative Quantifizierung der Gene PGRMC1 und PGRMC2 realisiert. Dafür wurde die komparative $\Delta\Delta C_t$ -Methode gemäss Anleitung von Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und wie bereits früher beschrieben verwendet (Kowalewski et al., 2006; Kowalewski et al., 2009; Müller, 2010). Bei dieser Methode werden die Ergebnisse des Zielgens sowohl mit einem Kallibrator (Probe mit dem höchsten ΔC_t -Wert), als auch mit einem Normalisator (Referenzgen) verglichen. Im ersten Schritt wird der ΔC_t -Wert für jede mRNA-Probe berechnet. Hierzu wird der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) der CT-Werte aus der Doppelbestimmung des Zielgens von dem des Referenzgens subtrahiert (A).

$$(A) \quad (\bar{x} C_{t-\text{Zielgen}}) - (\bar{x} C_{t-\text{Referenzgen}}) = \Delta C_{t-\text{Probe}}$$

Im zweiten Schritt wird von dem berechneten ΔC_t -Wert der Probe, der ΔC_t -Wert des Kalibrators, also die Probe mit der niedrigsten Genexpression subtrahiert und man erhält den $\Delta\Delta C_t$ -Wert (B).

$$(B) \quad \Delta C_{t-\text{Probe}} - \Delta C_{t-\text{Kalibrator}} = \Delta\Delta C_t$$

Um schlussendlich die relative Genexpression (RGE) darzustellen, wurde folgende Formel (C) verwendet:

$$(C) \quad RGE = 2^{(-\Delta\Delta C_t)}$$

Die relative Genexpression zeigt die n-fache Überexpression relativ zu den benutzten Referenzgenen (GADPH und SUZ12) und normalisiert zu dem Kalibrator, der Probe mit dem geringsten cDNA-Gehalt.

5.2.4.4 Statistik

Die statistische Analyse wurde mithilfe des Softwareprogramms GraphPad 3.06 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Für die statische Auswertung wurden, wie unter 5.2.4.3 beschrieben, die berechneten Werte der relativen Genexpression (RGE) benutzt. Für eine bessere Darstellung wurde der dekadische Logarithmus verwendet: $\text{Log}_{10}(2^{-(\Delta\Delta\text{-CT})})$. Da die Daten nicht normalverteilt waren, wurde mit einer nicht-parametrischen Varianzanalyse (Kruskal-Wallis Test) das Signifikanzniveau der untersuchten Genexpression getestet, wobei $p > 0,05$ als nicht signifikant definiert wurde. Aufgrund der großen Unterschiede in der Verteilung der Daten wurden diese in der vorliegenden Studie als geometrische Mittelwerte mit geometrischer Standardabweichung ($\bar{X}_g \times \text{SD}$) präsentiert.

5.3 Western Blot

5.3.1 Proteinisolierung

Die Gewebeproben ($n = 3$ Tiere / Trächtigkeitsmonat) wurden zu ungefähr 1×1 cm großen Stücken mit einem Skalpell zugeschnitten und in ein Reagenzglas, unter der Zugabe von 1ml NET-2-Puffer (vergleiche 9 Anhang), versetzt mit $10\mu\text{l/ml}$ Proteaseinhibitor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), überführt und homogenisiert. Im Einklang mit früher publizierten Protokollen (Kowalewski et al., 2011; Sprekeler et al., 2012; Gram et al., 2013) wurde die Extraktion der Proteine und die nachfolgende Gelelektrophorese wie folgt durchgeführt: Die Proben wurden bei $+4^\circ\text{C}$ für 10 Minuten bei $10'000g$ zentrifugiert, der flüssige Überstand abpipettiert und in einem 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis bei 75 Watt für 15 Sekunden mit Ultraschall (Vibra-Cell™ Ultrasonic Liquid Processor, Sonics & Materials, Inc., Newtown, CT, USA) behandelt. Anschließend wurde in Einwegküvetten (Semimicrovolume Cuvettes, BioRad, Reinach, Schweiz) die Proteinkonzentration der Proben nach der Bradfordmethode (Bradford Quick Start, BioRad, Reinach, Schweiz) in einem Photospektrometer (SmartSpec™ Plus Spectrophotometer, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) bestimmt. Zum Schluss wurden 20 - 30 μg Proteine je Probe mit NET-2-Puffer und 4-fach Sample-Puffer (siehe 9 Anhang) verdünnt, um die gewünschte Konzentration von ungefähr $1,4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erreichen.

5.3.2 Gelelektrophorese

Um die Proteine anhand ihres Molekulargewichtes aufzutrennen wurde das Verfahren der Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Hierfür wurde ein 12%iges Polyacrylamid-Gel benutzt, welches vor der Anwendung gegossen wurde und folgende Komponenten besitzt:

Tabelle 8: Zusammensetzung des 12%igen Polyacrylamid-Gels

	<i>Komponenten</i>	<i>Menge (µl)</i>
<i>Sammelgel 5 %</i>	Polyacrylamid 40% ¹	500
	1 M Tris (pH= 6.8)	500
	10% Ammoniumpersulfat ² (APS)	40
	10% SDS	40
	TEMED ³	4
	steriles bidest. Wasser	2920
	<i>Gesamtvolumen des Sammelgels:</i>	<i>4000</i>
<i>Trenngel 12%</i>	Polyacrylamid 40% ¹	2400
	1 M Tris (pH=8.8)	2000
	10% Ammoniumpersulfat ² (APS)	80
	10% SDS	80
	TEMED ³	5
	steriles bidest. Wasser	3440
	<i>Gesamtvolumen des Trenngels:</i>	<i>8000</i>

1) 40% Acrylamid/Bis Solution, MBI Fermentas, Le Mont-sur-Lausanne, Schweiz

2) APS Ammoniumpersulfate, Bio-Rad, Reinach, Schweiz

3) TEMED = Tetraethylenmethyldiamin, Bio-Rad, Reinach, Schweiz

Das Gel besteht somit aus zwei verschiedenen Schichten mit unterschiedlichen pH-Werten und Porenstrukturen. Dem grobporigen Sammelgel, in dem die Proteine zu einem schmalen

Band zusammengeführt werden und einem kleinporigen Trenngel, in dem die Auftrennung nach Molekulargewicht der Proteine vollzogen wird. Bevor die Proben (je 20 µl/Tasche) in das vorbereitete Gel pipettiert wurden, wurden sie für 10 Minuten bei 95°C erhitzt. Die äußerste Tasche des Gels wurde mit 12 µl Molekulargewichtsmarker (10kDa bis 250kDa) (PrecisionPlusProtein™, Dual Color Standards, Bio-Rad, Rheinach, Schweiz) beladen, um die Größe der detektierten Proteine bestimmen zu können. Die Elektrophorese fand in einer mit Laufpuffer (siehe 9 Anhang) gefüllten Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean® & Tetracell, BioRad, Reinach, Schweiz) statt. Nach dem Durchlaufen des Sammelgels bei einer Spannung von 80 Volt (V) wurden die Proteine im Trenngel bei 120 V separiert. Direkt nach der Separation wurden die Proteine in eine mit Transferpuffer (siehe 9 Anhang) gefüllten Kammer, einem sogenannten Tankblotsystem (Criterion Blotter, BioRad, Basel, Schweiz), auf eine mit Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immuno-Blot™ PVDF-Membran, Bio-Rad, Basel, Schweiz) elektrophoretisch übertragen (geblottet). Dieser Proteintransfer erfolgte unter Kühlung bei einer Spannung von 100V für 60 Minuten. Die so auf die PVDF-Membran übertragenen Proteine können nun immunhistochemisch nachgewiesen werden. Hierfür wurden zuerst die noch freien Bindungsstellen durch 60-minütiges Inkubieren in einer Blockierlösung (PBST + 5% Magermilchpulver, für PBST siehe 9 Anhang) gesättigt, um eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an die Membranoberfläche zu verhindern. Anschließend wurde die Blockierlösung abgegossen und die PVDF-Membran mit den in 2,5%iger Magermilchlösung (PBST + 2,5% Magermilchpulver) verdünnten Primärantikörpern versetzt (Primärantikörper und ihre Verdünnungen siehe Tabelle 9). Die Inkubation erfolgte bei +4°C über Nacht.

Tabelle 9: Primärantikörper für den Western Blot

<i>Protein</i>	<i>Primärantikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>erzeugt in</i>	<i>Verdünnung</i>
PGRMC1	polyklonaler PGRMC1-Antikörper (HAP002877)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	Kaninchen	1:250
PGRMC2	monoklonaler PGRMC2-Antikörper (ab56711)	Abcam, Cambridge, UK	Maus	1:200
β-AKTIN	monoklonaler β-AKTIN-Antikörper (sc-69879)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA	Maus	1:10000

Am folgenden Tag wurde der Primärantikörper abpipettiert und die Membran dreimal für je 10 Minuten in PBST bei RT gewaschen. Anschließend wurden die in 2,5%iger Magermilchlösung (PBST + 2,5% Magermilchpulver) verdünnten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 10) aufgetragen und die Membranen 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Sekundärantikörper sind mit Merettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidas, HPR) konjugiert, welche verantwortlich ist für die spätere Nachweisreaktion. Nach der Inkubation folgen fünf 10-minütige Waschschrte in PBST bei RT, um nicht gebundene sekundäre Antikörper zu entfernen.

Tabelle 10: verwendete Sekundärantikörper für den Western Blot

<i>Protein</i>	<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>erzeugt in</i>	<i>Verdünnung</i>
PGRMC1	Kaninchen-IgG (sc-2056)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, BW, Deutschland	Esel	1:7500
PGRMC2	Maus-IgG (W401B)	Promega, Dübendorf, Schweiz	Ziege	1:7500
β-AKTIN	Maus-IgG (W401B)	Promega, Dübendorf, Schweiz	Ziege	1:7500

Für den Proteinnachweis wurden die Membranen jeweils 5 Minuten lang in einem Immun-Star™WesternC™Chemiluminescent Kit Substrat (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), hergestellt gemäß den Angaben des Herstellers, inkubiert. Die Signale wurden mit dem Molecular Imager ChemiDoc XRS+ System und der Image Lab Software (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) detektiert. Um das Molekulargewicht der gesuchten Proteine ablesen zu können, wurden die Banden des Molekulargewichtsmarkers mit einem phosphoreszierenden Tintenmarker (Glow Writer, MIDSCI, St. Louis, Mo, USA) visualisiert. Die gleichmäßige Ladung der verwendeten Proben in die Geltaschen und die ordnungsgemäße Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wurde für jeden durchgeführten Western Blot durch eine Ladekontrolle mit einem ubiquitär vorkommenden Protein (β-AKTIN) überprüft. Hierfür wurden die Membranen nach der Detektion für 60 Minuten in 0,1 M Glyzin, pH 2,6 (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, Schweiz, siehe 9 Anhang) reblottet, das heißt alle bereits gebundenen Antikörper wurden durch den sauren pH-Wert des Glycins denaturiert. Anschließend werden die Schritte des immunologischen Nachweises, wie oben beschrieben, mit dem β-AKTIN-Antikörper (siehe Tabelle 9 und 10) wiederholt. Eine Positivkontrolle wurde mit humanem Myometrium und denselben Primärantikörpern durchgeführt.

5.3.3 Auswertung

Die Berechnung und die graphische Darstellung der Daten wurde mit dem Programm Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) durchgeführt. Für die statistische Datenanalyse wurde das Programm GraphPad 3.06 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) verwendet (siehe 5.4.3.1).

Die Expression der Proteinlevel wurde mit Hilfe des Softwareprogramms Image Lab (Bio-Rad laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) anhand der optischen Dichte der im Western Blot erhaltenen Proteinbanden bestimmt. Die für die Statistik verwendeten SOD-Werte (Standardized Optical Density) beschreiben hierbei das Verhältnis der optischen Dichte der Banden des Zielproteins mit denen des Referenzproteins β -AKTIN. Jeder Western Blot wurde dreimal durchgeführt ($n = 3$ Tiere/Trächtigkeitsmonat) und die kalibrierten SOD-Werte graphisch in Form des arithmetischen Mittelwerts \pm Standardabweichung dargestellt.

5.3.3.1 Statistik

Die kalibrierten SOD-Werte der untersuchten Proben wurden mit Hilfe des Programms GraphPad 3.06 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) statistisch untersucht. Aufgrund der fehlenden Normalverteilung der Daten wurde eine nicht-parametrische Varianzanalyse (Kruskal-Wallis-Test) durchgeführt um das Signifikanzniveau zu testen. Dabei wurde $p > 0,05$ als nicht signifikant definiert.

5.4 Immunhistochemie

5.4.1 Prinzip

Die Immunhistochemie ist ein Verfahren, welches genutzt wird, um Proteine oder andere immunogene Strukturen direkt im Gewebe mittels spezifischer Antikörper und einer Farbstoffreaktion nachzuweisen. Der deutliche Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die gesuchte Antigenstruktur in einem histologischen Gewebeschnitt nachgewiesen wird und man so nicht nur Information über die Präsenz des Proteins bekommt, sondern auch über dessen Lokalisation und Verteilungsmuster. Es ist eine weite Bandbreite an verschiedenen direkten und indirekten immunhistochemischen Techniken etabliert (siehe Übersicht Noll et al., 2000). Die direkten Methoden arbeiten nach einer klassischen Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei der Primärantikörper direkt mit einem Farbstoff oder Markerenzym gekoppelt ist, sodass die Reaktion detektiert werden kann. Bei den indirekten immunhistochemischen Techniken setzt man zusätzlich zu einem unkonjugierten Primärantikörper, einen mit Farbstoff oder mit einem

Enzym markierten Sekundärantikörper ein, was zu einer hohen Signalverstärkung und damit zu einer deutlich höheren Sensitivität führt (Noll et al., 2000). In dieser Studie wurde ausschließlich mit der indirekten ABC-Methode ((Strept-)Avidin-Biotin-Komplex) gearbeitet. Vorteil dieser Variante ist eine Erhöhung der Sensitivität durch die hohe Bindungsaffinität von Avidin beziehungsweise Streptavidin zu dem Vitamin Biotin. Bei dieser Methode setzt man nebst dem antigenspezifischen Primärantikörper, der an das antigene Epitop bindet, einen biotinylierten, also mehrfach mit Biotin markierten, Sekundärantikörper ein. An diesem biotinylierten Sekundärantikörper kann nun der (Strept)Avidin-Biotin-Komplex binden, welcher wiederum mit einem Enzym (Merrettichperoxidase) versetzt ist. Im letzten Schritt kann man mit der Zugabe eines Chromogens (Substrat), durch eine stattfindende Enzym-Substrat-Reaktion, den Komplex farblich visualisieren (Noll et al., 2000).

5.4.2 Durchführung

Für den immunhistochemischen Nachweis von PGRMC1 und PGRMC2 wurden aus den bereits Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (siehe 5.1.2.2), 3 µm dicke Paraffinschnitte mit einem Rotationsmikrotom (RM1160®, Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland) hergestellt und anschließend auf SuperFrost Plus® Objektträgern (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) gezogen. Die Objektträger wurden für 12 Stunden bei +37°C in einem Wärmeschrank (BE 400/3 TWW, Memmet GmbH, Schwabach, Deutschland) getrocknet (Müller, 2010). Das weitere Verfahren wurde gemäß früherer, veröffentlichter Protokolle (Kowalewski et al., 2006; Srekeler et al., 2012) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die Schnittpräparate (n= 2 Tiere / Trächtigkeitsmonat) entparaffiniert und rehydriert. Dafür wurden sie zuerst zweimal jeweils für 10 Minuten in Xylol und anschließend zweimal für jeweils 2 Minuten in eine absteigende Alkoholreihe getaucht. Die Alkoholreihe war wie folgt konzentriert: von 100% Ethanol über 96% Ethanol bis zu 70% Ethanol. Nach der Entparaffinierung der Schnitte wurde eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung in einer Mikrowelle durchgeführt, um gegebenenfalls durch Proteinvernetzungen verdeckte Epitope der Antigene für die Primärantikörper wieder zugänglich zu machen (Noll et al., 2000). Hierzu wurden die Schnitte dreimal jeweils für 5 Minuten in 10mM Zitratpuffer mit einem pH von 6.0 (siehe 9 Anhang) in der Mikrowelle bei 500 Watt erwärmt. Anschließend kühlten die Schnitte bei RT für 20 Minuten ab und wurden 5 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gespült. Um die Enzymtätigkeit der endogenen Peroxidasen zu hemmen, wurden die Schnitte im nächsten Schritt für 30 Minuten in Methanol, versetzt mit 3%igem Wasserstoffperoxid, inkubiert. Nach einem Waschschriff mit IHC / 0,3% Triton X-Puffer, pH 7.2-7.4 (siehe 9 Anhang), wurden während 20 Minuten

nichtspezifisch gebundene Proteine mithilfe eines Serums aus der Tierart, in welcher der jeweilige Sekundärantikörper produziert wurde, blockiert. Es folgte die Inkubation in einer feuchten Kammer mit dem jeweiligen in IHC / 0,3% Triton X-Puffer verdünnten Primärantikörper (Primärantikörper und ihre Verdünnung siehe Tabelle 11) bei +4°C über Nacht. Am Folgetag wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen mit IHC / 0,3% Triton X-Puffer in dem jeweiligen biotinylierten Sekundärantikörper für 30 Minuten bei RT inkubiert (Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen siehe Tabelle 12). Nach einem weiteren 5-minütigen Waschschrift mit IHC / 0,3% Triton X-Puffer wurden die Schnitte zur Signalverstärkung für 30 Minuten bei RT mit der Straptavidin-Peroxidase Vectastain ABC Kit-Lösung (Vector Laboratories, Inc., Burlingham, CA, USA) bedeckt. Für die Visualisierung wurde nach 5-minütigem Waschen mit IHC / 0,3% Triton X-Puffer das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) (liquid DAB+ Substrat Kit, Dako Schweiz AG, Baar, Schweiz) auf die Schnitte aufgetragen. In den letzten Schritten wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gespült, nach Böck P. in Hämalun gegengefärbt und anschließend in eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol gegeben (Böck et al., 1989). Schlussendlich wurden die Schnitte maschinell mit Pertex® (Biosystems Switzerland AG, Muttenz, Schweiz) unter einem Deckglas eingedeckt.

Das detaillierte Protokoll für die Entparaffinierung, Dehydrierung und immunhistochemische Färbung ist für PGRMC1 in der Tabelle 13 und für PGRMC2 in der Tabelle 14 im Anhang aufgeführt.

Tabelle 11: Primärantikörper und die entsprechenden Verdünnungen

<i>Protein</i>	<i>Primärantikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>erzeugt in</i>	<i>Verdünnung</i>
PGRMC1	polyklonaler PGRMC1-Antikörper (HAP002877)	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Buchs, Schweiz	Kaninchen	1:750
PGRMC2	monoklonaler PGRMC2-Antikörper (ab56711)	Abcam, Cambridge, CB4 0FL, UK	Maus	1:200

Tabelle 12: Sekundärantikörper und die entsprechenden Verdünnungen

<i>Protein</i>	<i>Sekundärantikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>erzeugt in</i>	<i>Verdünnung</i>
PGRMC1	Kaninchen-IgG (BA-1000)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA	Ziege	1:100
PGRMC2	Maus-IgG (BA-2000)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA	Pferd	1:100

5.4.3. Kontrollen

Um die Spezifität der immunhistochemischen Reaktion zu überprüfen, wurden bei jedem Antigennachweis für jede Serie zwei verschiedene Kontrollen durchgeführt. Anhand der sogenannten Leerkontrolle, bei der anstatt des Primärantikörpers IHC / 0,3% Triton X-Puffer verwendet wurde, wurde die Spezifität der Sekundärantikörper evaluiert. Für die Kontrolle der Bindungsspezifität des Primärantikörpers wurden Isotypenkontrollen durchgeführt. Hierfür wurden anstatt des Primärantikörpers isotypenspezifische Seren, Rabbit IgG Serum für PGRMC1 (I-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) und Mouse IgG1 Serum für PGRMC2 (ABIN376357, antibodies-online, Aachen, Deutschland), mit der identischen Proteinkonzentration des jeweiligen Primärantikörpers verwendet.

6 Ergebnisse

6.1 PGRMC1 im bovinen Uterus und in der Plazenta während der Trächtigkeit

6.1.1 mRNA-Expression

Das mRNA-Level von PGRMC1 im Uterus und in der Plazenta von 45 trächtigen Rindern (n= 5 Tiere/Trächtigkeitsmonat) wurde mit Hilfe der semi-quantitativen RealTime(TaqMan®)-PCR bestimmt. In jedem Monat der Trächtigkeit (1.-9.) konnte die mRNA sowohl in der bovinen Uteruswand (Abbildung 9A), als auch im Plazentom (Abbildung 9B) detektiert werden. Es zeigte sich eine relativ konstante Expression dieses Gens während der gesamten Gravidität. In beiden Strukturen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$) der mRNA-Expression von PGRMC1 zwischen den verschiedenen Trächtigkeitsmonaten. Es wurde dabei eine hohe Streuung der Gen-Expression beobachtet.

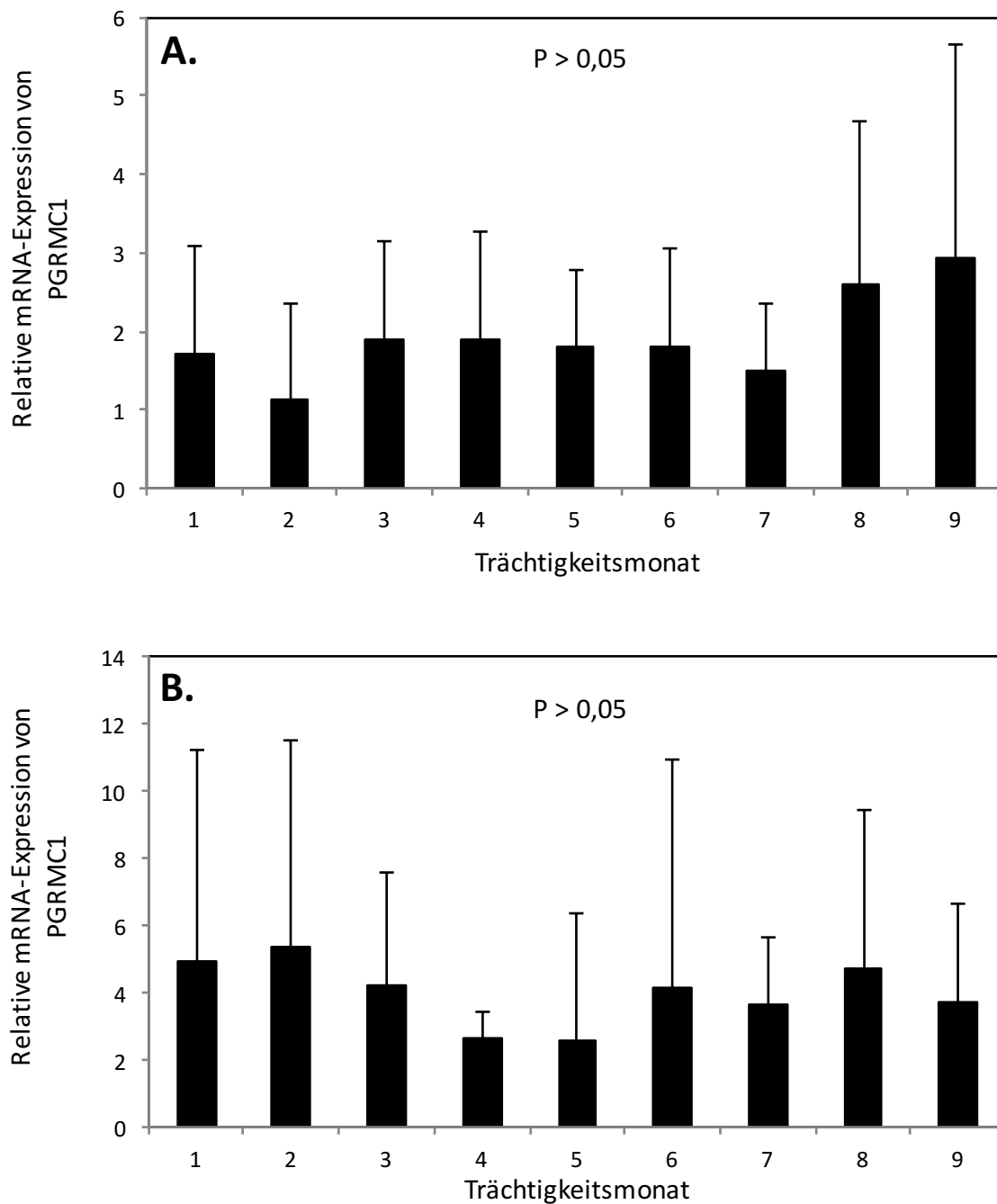


Abbildung 9: Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von PGRMC1 mittels RealTime(TaqMan®)-PCR während der Trächtigkeit beim Rind (Xg x SD)

A: Bovine Uteruswand während der gesamten Trächtigkeit. Dargestellt sind die Monate 1 - 9 der Gravidität

B: Bovine Plazenta während der gesamten Trächtigkeit, 1.-9. Monat

6.1.2 Proteinexpression

Die Proteinexpression von PGRMC1 wurde mittels Western Blot untersucht und die Signalstärke der Proteinanden wurden anhand der optischen Dichte in Relation zu der des verwendeten Referenzproteins β -AKTIN gemessen und als SOD (Standardized Optical Density) angegeben. Pro Trächtigkeitsmonat wurden die Proben von drei Rinden ($n=3$ Tiere/Trächtigkeitsmonat) untersucht. Sowohl in der Uteruswand (Abbildung 10A, B), als auch in der Plazenta (Abbildung 10C, D) konnte ein klar ausgeprägtes Proteinband von ungefähr 25 kDa in jedem Monat der Trächtigkeit detektiert werden. Dieses Proteinband zeigte die gleiche Größe, wie das Proteinband im humanen Myometrium, welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde (Abbildung 10B und 10D). Repräsentative Western Blots sind in den Abbildungen 10A - 10D gezeigt. Die kontinuierliche Intensität der detektierten Proteinbanden im Western Blot deckt sich in beiden Strukturen, mit der Auswertung der SOD: hier ist eine relative Konstanz der Proteinexpression im Uterus (Abbildung 11A) und im Plazentom (Abbildung 11B) während der Gravidität zu vermerken. Statistisch konnten keine signifikanten Unterschiede ($p > 0.05$) zwischen den einzelnen Monaten der Trächtigkeit erfasst werden.

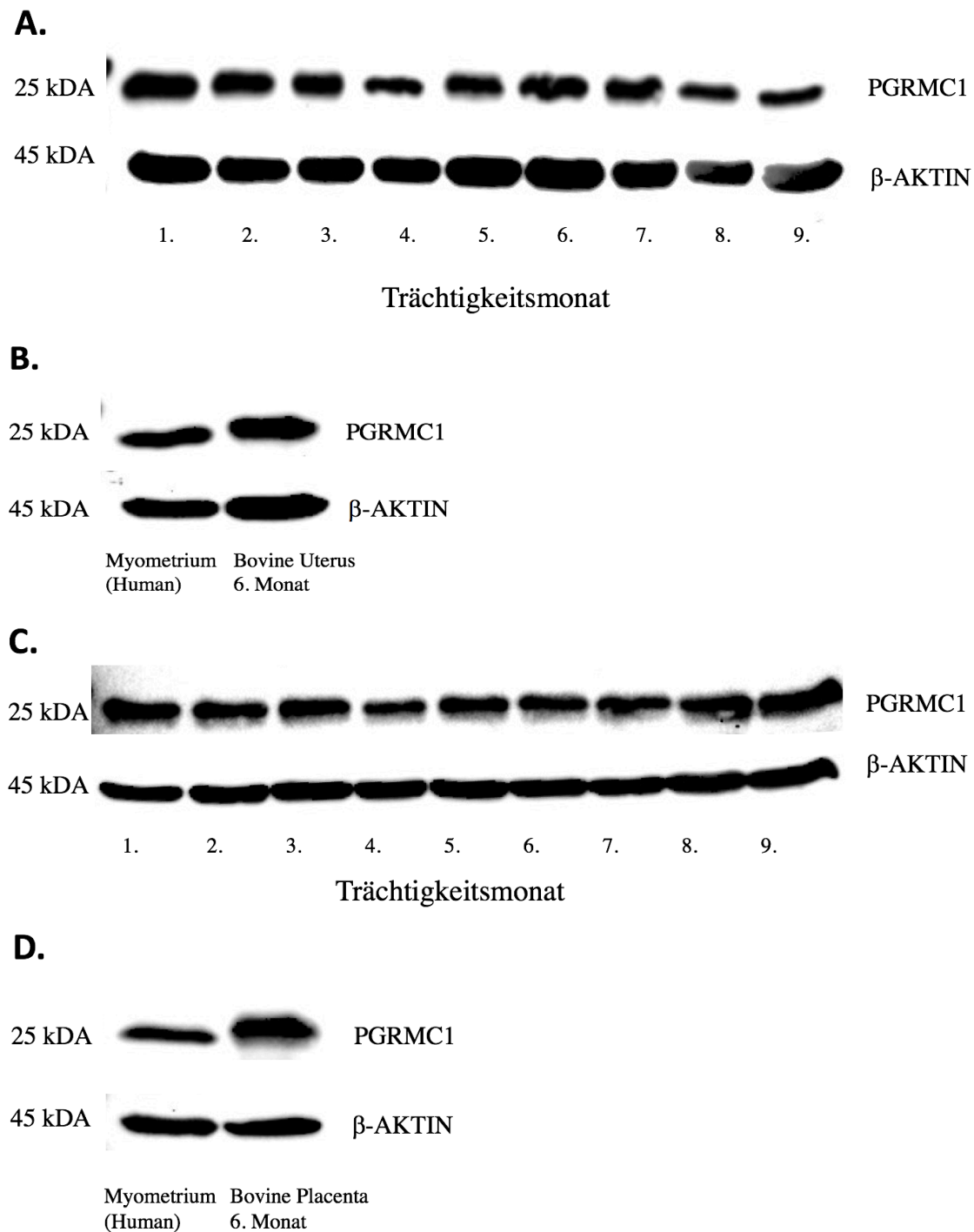


Abbildung 10: Proteinexpression von *PGRMC1* und dem verwendeten Referenzprotein β -AKTIN mittels Western Blot während der Trächtigkeit beim Rind

A: Repräsentative Western Blots, bovine Uteruswand, 1. – 9. Trächtigkeitsmonat

B: Positivkontrolle, humanes Myometrium im Vergleich zur bovinen Uteruswand im 6. Monat der Trächtigkeit

C: Repräsentative Western Blots, bovine Placenta, 1. -9. Trächtigkeitsmonat

D: Positivkontrolle, humanes Myometrium im Vergleich zur bovinen Placenta im 6. Monat der Trächtigkeit

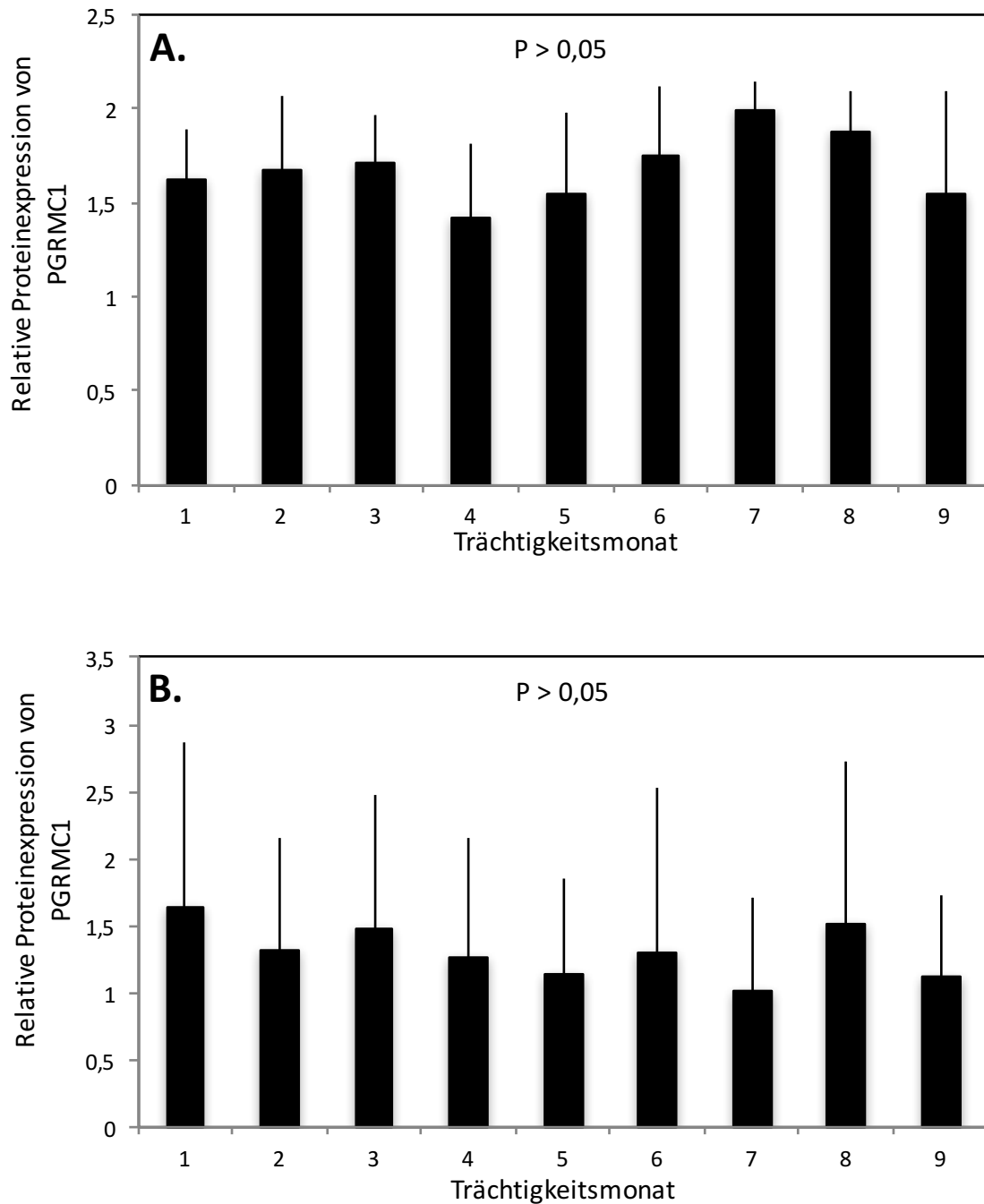


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Proteinexpression von PGRMC1

Gemessen anhand der optischen Dichte, SOD (Standardized Optical Density), relativ zu der Expression von β -AKTIN, mithilfe der Image Lab Software.

A: Relative Proteinexpression von PGRMC1 in der bovinen Uteruswand, während der gesamten Gravidität (1.-9. Trächtigkeitsmonate)

B: Relative Proteinexpression von PGRMC1 in der bovinen Placenta, während der Gravidität (1.-9. Trächtigkeitsmonate)

6.1.3 Immunhistochemische Lokalisation

Die immunhistochemischen Signale von PGRMC1 in den untersuchten Proben der Uteruswand und der Placenta (n= 2 Tiere/Trächtigkeitsmonat), waren in jedem Monat der Trächtigkeit (1.-9.) deutlich zu detektieren. In allen positiv gefärbten Zelltypen der beiden Gewebearten zeigten sich die Signale ausschließlich im Zytoplasma. Eine Braunfärbung des Nukleus wurde nicht beobachtet.

In der Uteruswand (Abbildungen 12-14, 16) befand sich die stärkste positive Reaktion durchgängig in den Zellen des endometrialen Oberflächenepithels (siehe Abbildung 12), der glandulären Epithelzellen und der Endothelzellen der Blutgefäße im Endometrium (Abbildung 13) und im Myometrium (Abbildung 14). Wobei sich kein Unterschied zwischen den oberflächlichen und tiefergelegenen Drüsenkörpern zeigte. Im Gegensatz dazu konnte in den glatten Muskelzellen des Myometriums (Abbildung 14) und in den Zellen des gesamten Stromas eine minimal schwächere Immunreaktion beobachtet werden.

Innerhalb der Plazentome (Abbildung 15, 17) konnte die kräftigste Färbung im maternalen Anteil, den Krypten, in den Zellen des maternalen Stromas und den Endothelzellen der maternalen Blutgefäße beobachtet werden. Etwas schwächere Signale zeigten sich innerhalb des maternalen Epithels. In den Krypten konnte eine stärkere Färbung an der Arkadenregion des Plazentoms bei den meisten Tieren beobachtet werden (Abbildung 15). Im fetalen Teil zeigte das Chorionepithel und das Stroma keine Färbung. Dafür waren auch hier die Endothelzellen der fetalen Blutgefäße stark immunpositiv. Die Intensität und die Lokalisation der Färbung variierte in beiden Geweben innerhalb des Verlaufes der Trächtigkeit nicht und spiegelt somit die Ergebnisse der untersuchten mRNA-Expression und der quantitativen Proteinausprägung wieder. Repräsentative Fotos der Immunhistochemie von PGRMC1, die den Trächtigkeitsverlauf zeigen, sind für den Uterus in Abbildung 16 A-F und für die Plazenta in Abbildung 17 A-F dargestellt. Die positiven Signale von PGRMC1 sind als deutliche Braunfärbung im Zytoplasma der Zellen zu erkennen. Die negativen Zellkerne stellen sich durch die Gegenfärbung mit Hämalaun blau dar. Die Isotypenkontrollen weisen keine Braunfärbung auf.

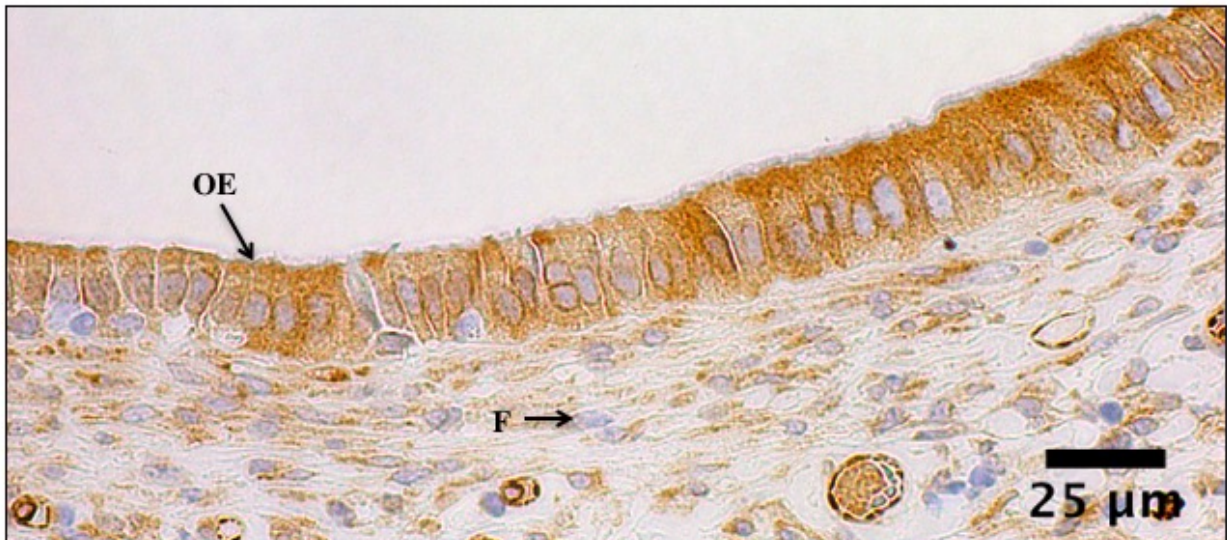


Abbildung 12: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC1 in der Uteruswand, 9. Monat der Trächtigkeit

OE: Oberflächenepithel; F: Fibroblast

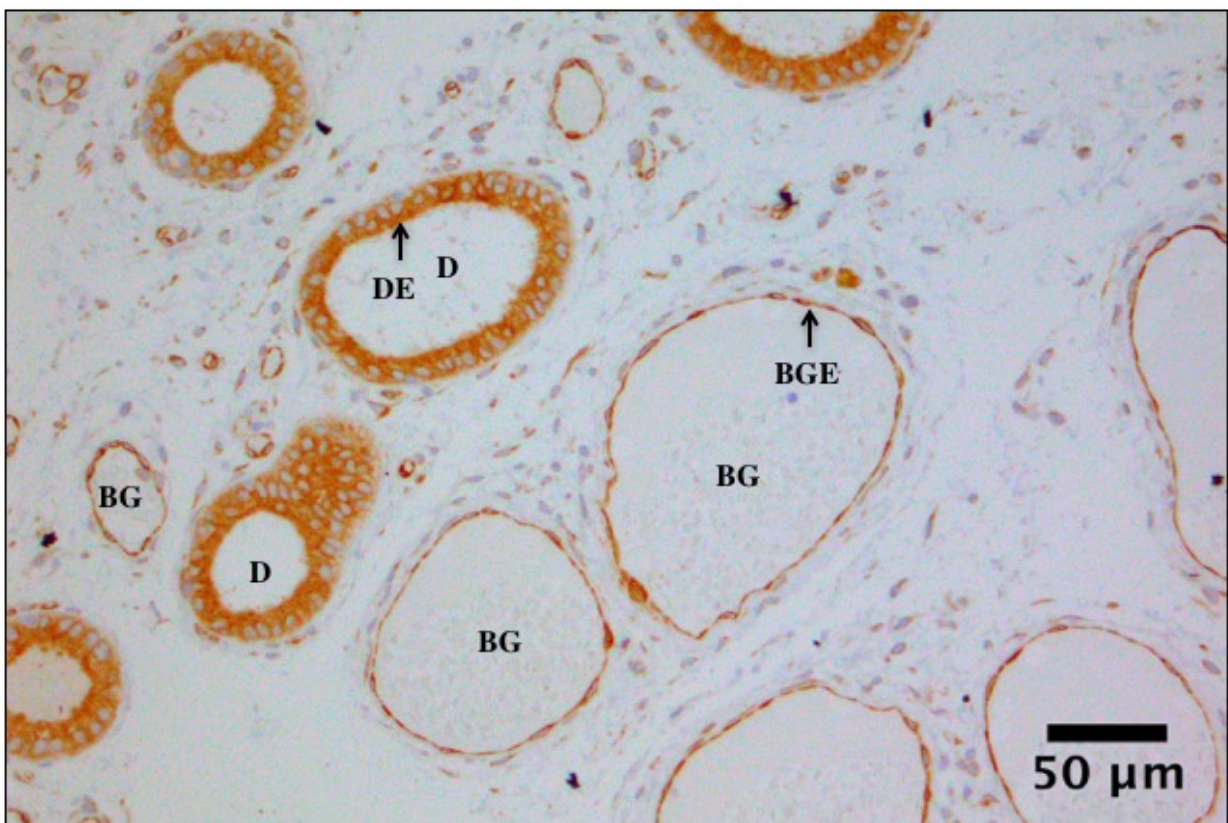


Abbildung 13: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC1 in der Uteruswand, 4. Monat der Trächtigkeit

D: Drüsen; DE: Drüsenepithel; BG: Blutgefäße; BGE: Blutgefässendothel

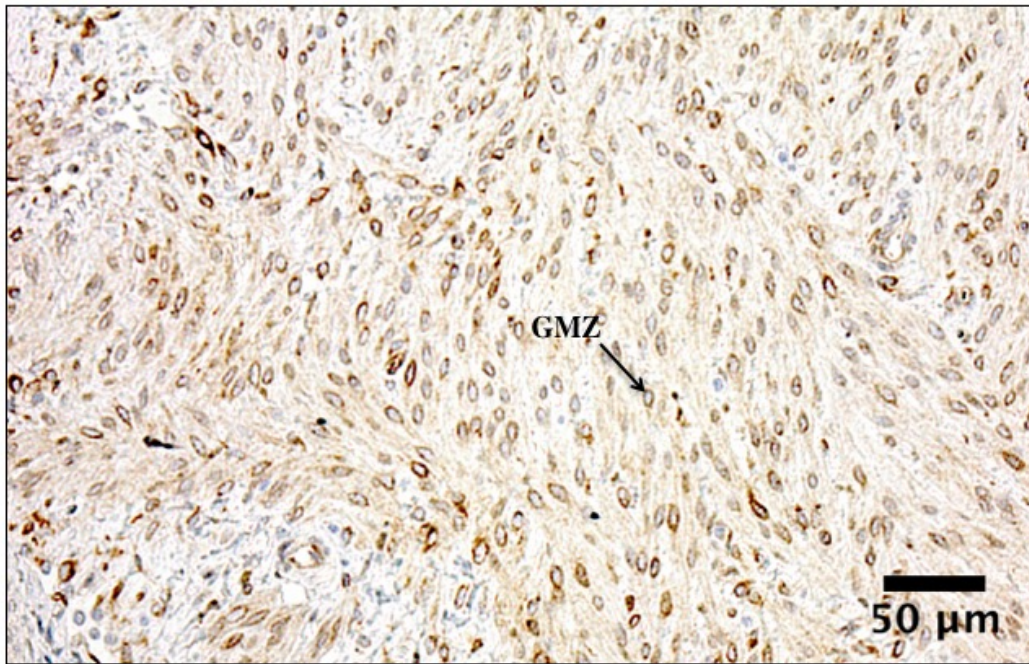


Abbildung 14: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC1 im Myometrium, 3. Monat der Trächtigkeit

GMZ: glatte Muskelzelle

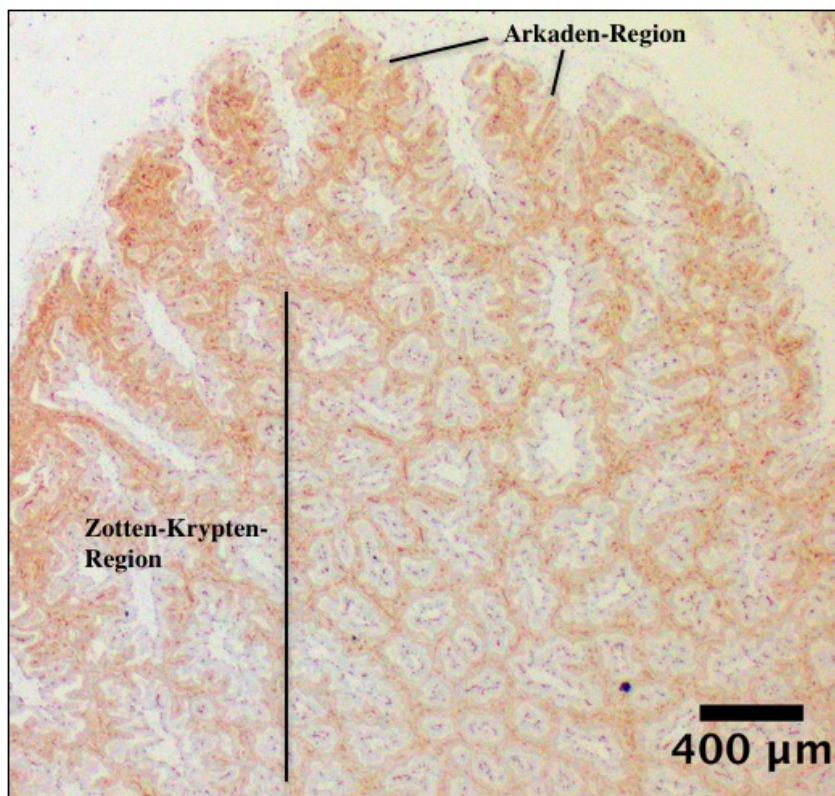
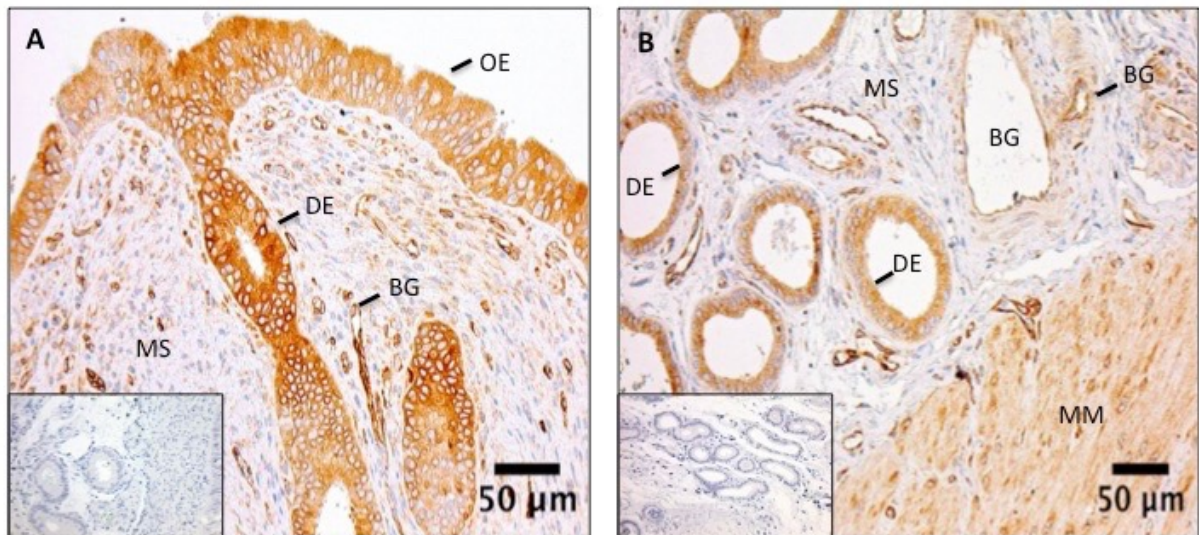
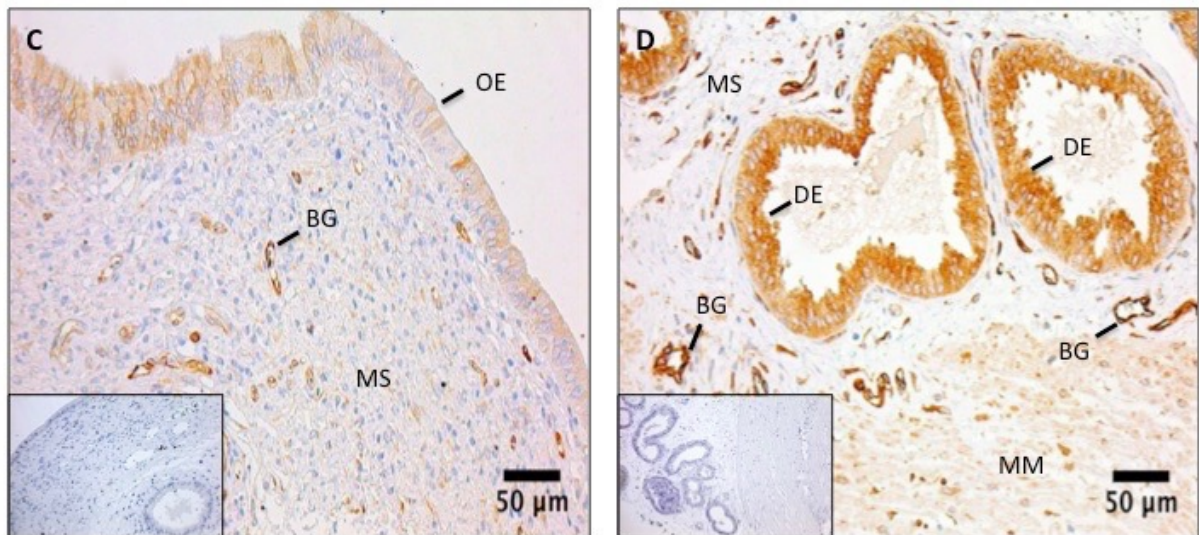


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC1 im Plazentom, 2. Trächtigkeitsmonat

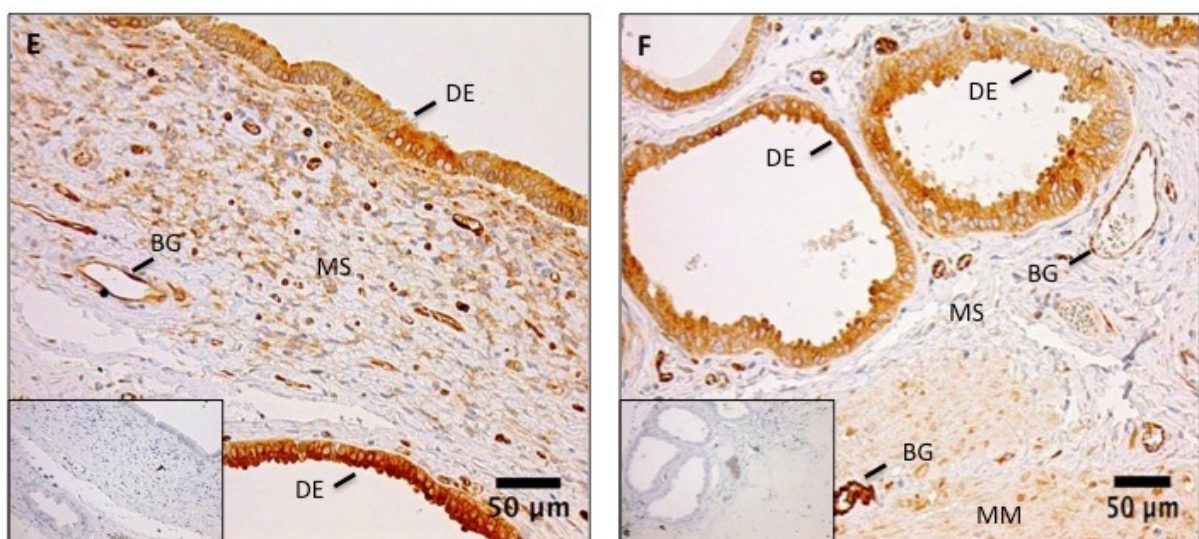
Im unteren Teil der Abbildung befindet sich die Zotten-Krypten-Region in der die fetalen Zotten der Kotyledonen von den maternalen Krypten der Karunkeln umgeben sind. Am oberen Bildrand ist die Arkadenregion zu sehen, welche die Oberfläche des Plazentoms bildet



3. Monat



6. Monat



9. Monat

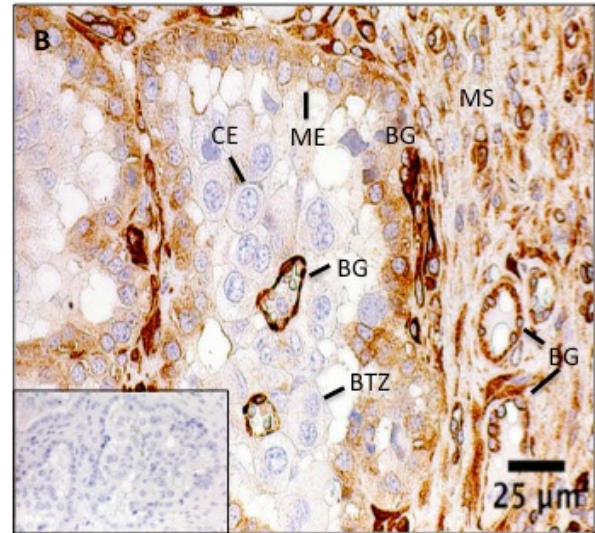
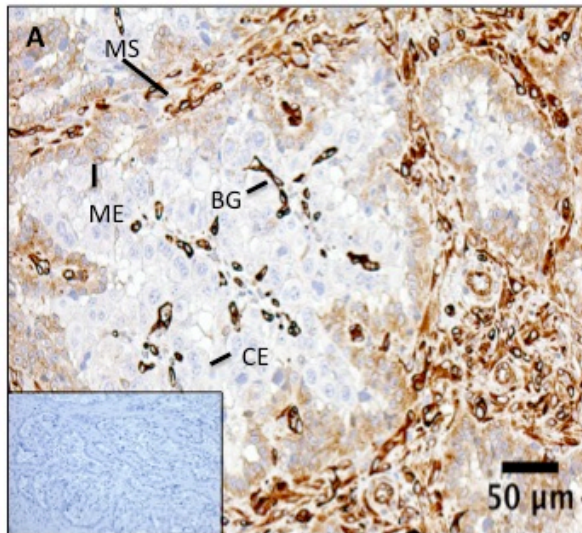
Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC1 in der interplazentomären bovinen Uteruswand während des Trächtigkeitsverlaufs

OE: Oberflächenepithel; DE: Drüsenepithel; MS: maternales Stroma; MM: Myometrium;
BG: Blutgefäß; Inlays: Isotypenkontrolle

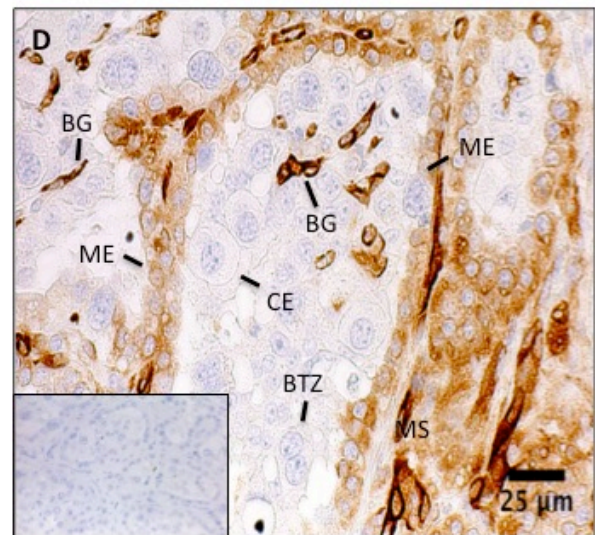
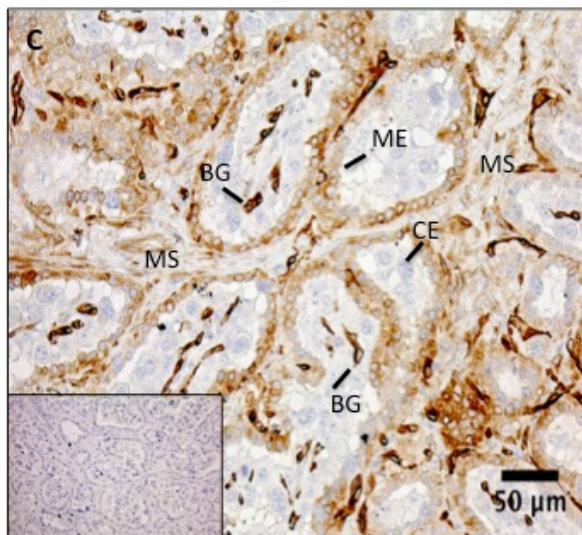
A, B: oberflächliches bzw. tiefes Endometrium sowie Myometrium, 3. Monat der Trächtigkeit

C, D: oberflächliches bzw. tiefes Endometrium sowie Myometrium, 6. Monat der Trächtigkeit

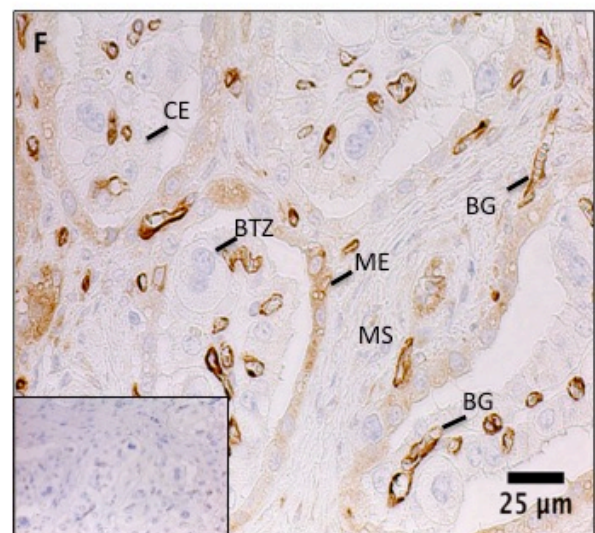
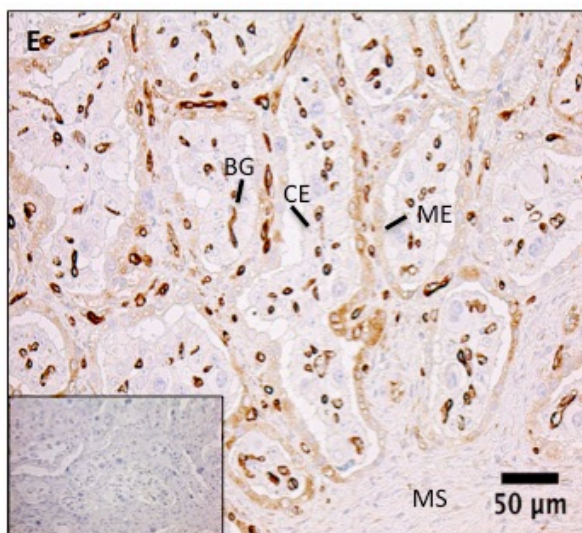
E, F: oberflächliches bzw. tiefes Endometrium sowie Myometrium, 9. Monat der Trächtigkeit



3. Monat



6. Monat



9. Monat

Abbildung 17: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC1 im bovinen Plazentom während des Trächtigkeitsverlaufs

ME: maternales Epithel; CE: fetales Chorionepithel; MS: maternales Stroma; BTZ: Binukleäre Trophoblastzellen; BG: maternale und fetale Blutgefäß; Inlay: Isotypenkontrolle; A, B: 3., C, D: 6. und E, F: 9. Monat der Trächtigkeit

6.2 PGRMC2 im bovinen Uterus und in der Plazenta während der Trächtigkeit

6.2.1 mRNA-Expression

Anhand der semi-quantitativen RealTime(TaqMan®)-PCR konnte die Expression der mRNA von PGRMC2 in der Uteruswand (Abbildung 18A) und der Plazenta (Abbildung 18B) in jedem Monat der Trächtigkeit (1. -9.) in den Proben von 45 tragenden Rindern (n=5 Tiere/Trächtigkeitsmonat) nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine relativ konstante Expression des Gens in beiden untersuchten Gewebearten während der Gravidität. Allerdings gab es eine relativ große individuelle Variation in der Gen-Expression. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Trächtigkeitsmonaten konnten somit nicht festgestellt werden ($p > 0.05$).

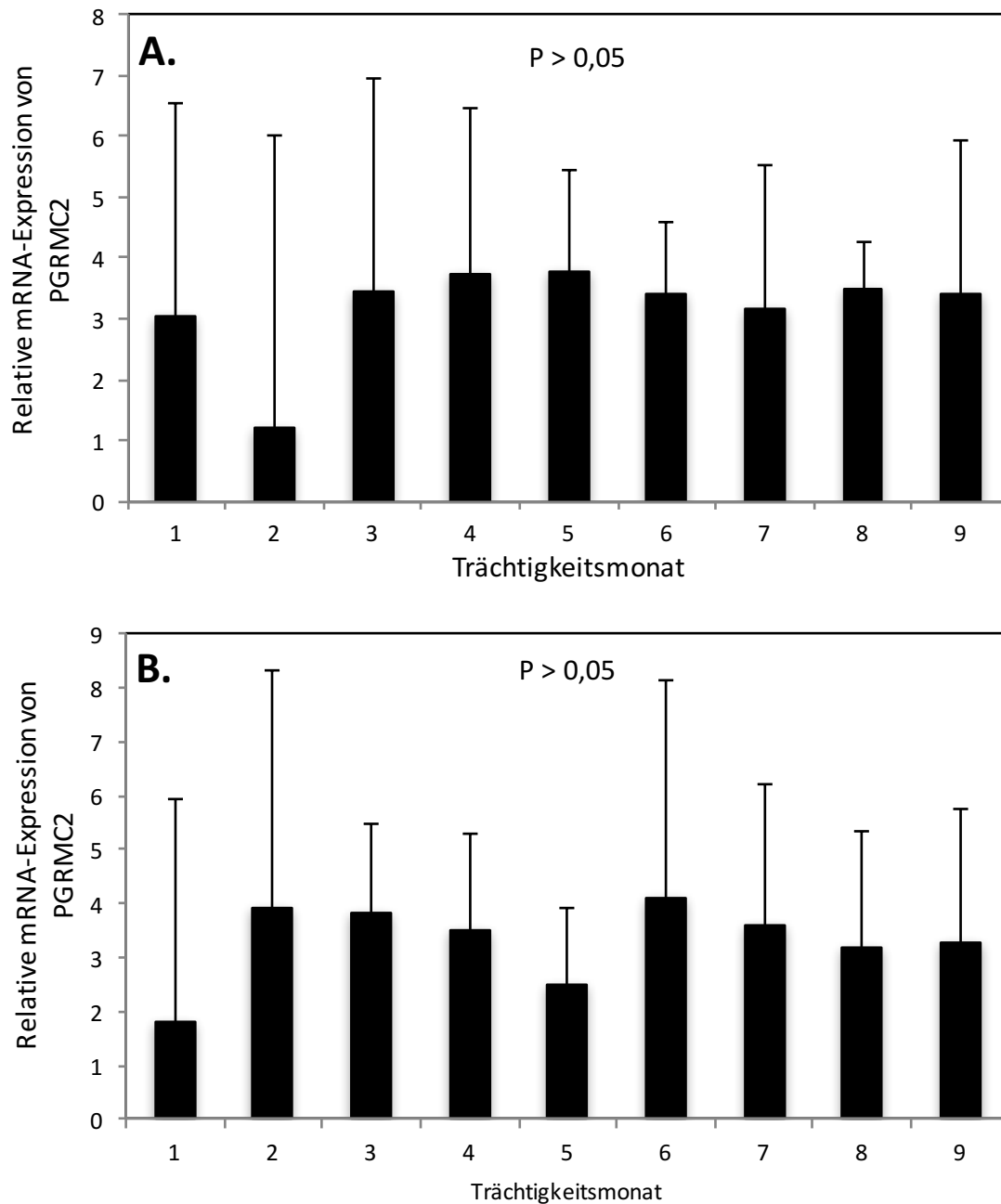


Abbildung 18: Graphische Darstellung der relativen mRNA-Expression von PGRMC1 mittels RealTime(TaqMan®)-PCR während der Trächtigkeit beim Rind ($Xg \times SD$)

A: Bovine Uteruswand während der Trächtigkeit. Dargestellt sind die Monate 1 - 9 der Gravidität.

B: Bovine Placenta während der gesamten Trächtigkeit, 1.-9. Monat

6.2.2 Proteinexpression

Das PGRMC2-Protein wurde in allen untersuchten Phasen der Gravidität mittels Western Blot-Verfahren in der Uteruswand (Abbildung 19A) und im Plazentom (Abbildung 19B) in relativ ähnlicher Intensität nachgewiesen.

Es zeigte sich in allen untersuchten Proben ($n = 3$ Tiere/Trächtigkeitsmonat) ein kräftiges Proteinband von ungefähr 25 kDa, welches dem in der Positivkontrolle glich (Abbildung 19B, 19D). Die SOD stellt die Signalstärke der Proteinbanden anhand der Messung der optischen Dichte, im Verhältnis zu der des Referenzproteins β -AKTIN dar und ist in der Abbildung 20 dargestellt. Zwischen den exprimierten Proteinmengen der einzelnen Monate der Trächtigkeit war kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) feststellbar. Abbildungen 19A - 19D zeigen repräsentative Abbildungen der durchgeführten Western Blots.

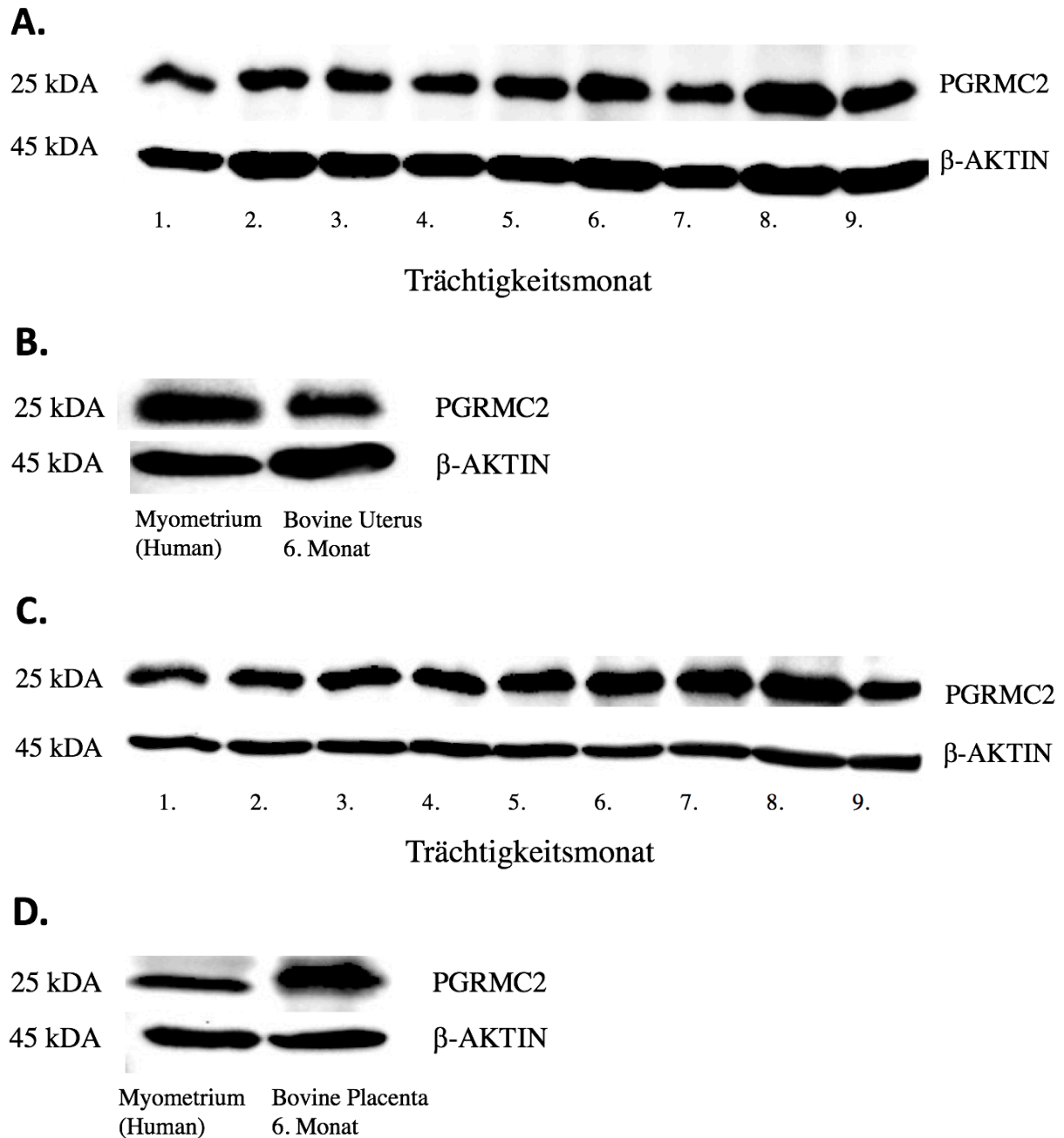


Abbildung 19: Proteinexpression von PGRMC2 und des verwendeten Referenzproteins β -Aktin mittels Western Blot während der Trächtigkeit beim Rind

A: Repräsentative Western Blots, bovine Uteruswand, 1. – 9. Trächtigkeitsmonat

B: Positivkontrolle, humanes Myometrium im Vergleich zur bovinen Uteruswand im 6. Monat der Trächtigkeit

C: Repräsentative Western Blots, bovine Placenta, 1. -9. Trächtigkeitsmonat

D: Positivkontrolle, humanes Myometrium im Vergleich zur bovinen Placenta im 6. Monat der Trächtigkeit

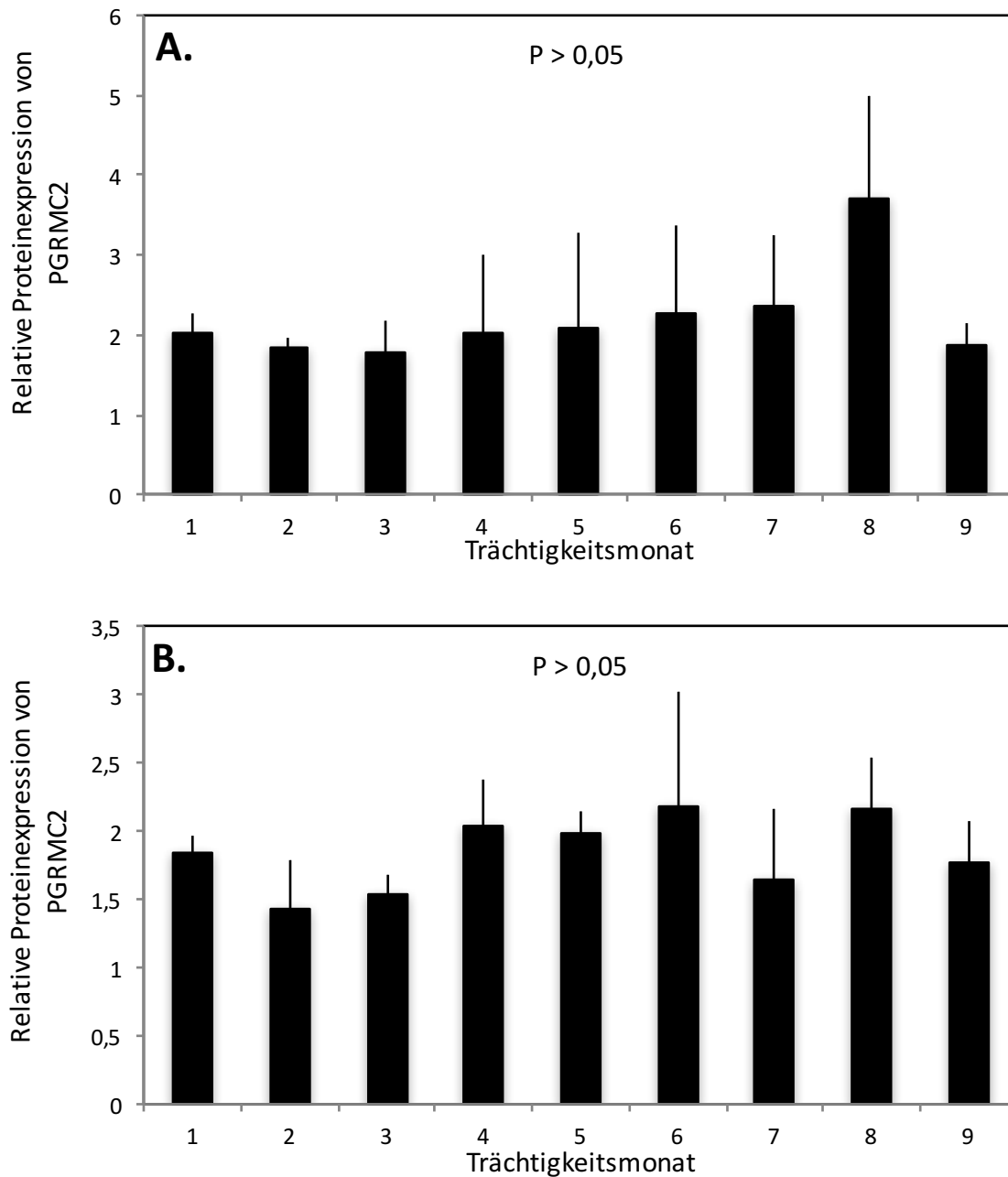


Abbildung 20: Graphische Darstellung der PGRMC2 Proteinexpression relativ zu der von β -Aktin gemessen anhand der optischen Dichte, SOD, mithilfe der Image Lab Software

A: Relative Proteinexpression in der bovinen Uteruswand während der gesamten Gravidität (1.-9. Trächtigkeitsmonate)

B: Relative Proteinexpression in der bovinen Placenta während der Gravidität (1.-9. Trächtigkeitsmonate)

6.2.3 Immunhistochemische Lokalisation

Bei der qualitativen Bestimmung der Lokalisation anhand des immunhistochemischen Nachweisverfahrens konnte das Protein PGRMC2 eindeutig bei allen Tieren (n=2 Tiere/Trächtigkeitsmonat) in jedem Monat der Gravidität (1.-9.) im Uterus und in der Plazenta nachgewiesen werden. Die Immunreaktion konnte ausschließlich im Zytoplasma als deutliche Braunfärbung beobachtet werden, wohingegen die Zellkerne sich nicht anfärbten und durch die Gegenfärbung mit Hämalaun blau erschienen.

Die stärksten uterinen Signale konnten in den Zellen des endometrialen Oberflächenepithels (Abbildung 21), der Epithelzellen der Uterindrüsen (Abbildung 22, 23) und in den Endothelzellen der Blutgefäße des Endometriums (Abbildung 23) und des Myometriums (Abbildung 24) detektiert werden. Ein Unterschied zwischen den oberflächlichen und tiefergelegenen Drüsen war nicht zu erkennen. In den glatten Muskelzellen des Myometriums sowie den Zellen des endometrialen Stromas war ein schwächerer Färbungsgrad zu beobachten.

Im maternalen Teil des Plazentoms zeigten sich die intensivsten Signale im endometrialen Kryptenepithel und im Endothel der maternalen Blutgefäße. Eine deutlich schwächere Immunreaktion war in den maternalen Stromazellen zu verzeichnen. Im fetalen Anteil war eine im Vergleich zum maternalen Epithel etwas schwächere Immunreaktion im Chorionepithel zu detektieren. Sowohl uni- wie auch binukleäre Trophoblastzellen zeigten eine Immunfärbung. In sämtlichen Chorionzotten war eine deutliche und intensive Färbung der Endothelzellen der Blutgefäße zu erkennen.

Abbildungen 25 und 26 zeigen repräsentative Fotos des Immunhistochemischen Nachweises von PGRMC2 innerhalb der Uteruswand (Abbildung 25) und der Plazenta (Abbildung 26) während des Verlaufes der Trächtigkeit. In beiden Strukturen konnte keine deutliche Veränderung zwischen den verschiedenen Trächtigkeitsmonaten in Bezug auf die Lokalisation und die Signalintensität beobachtet werden, was sich mit den Ergebnissen aus der RealTime-PCR und dem Western Blot deckt. Die Isotypenkontrollen weisen keinerlei Immunreaktion auf.

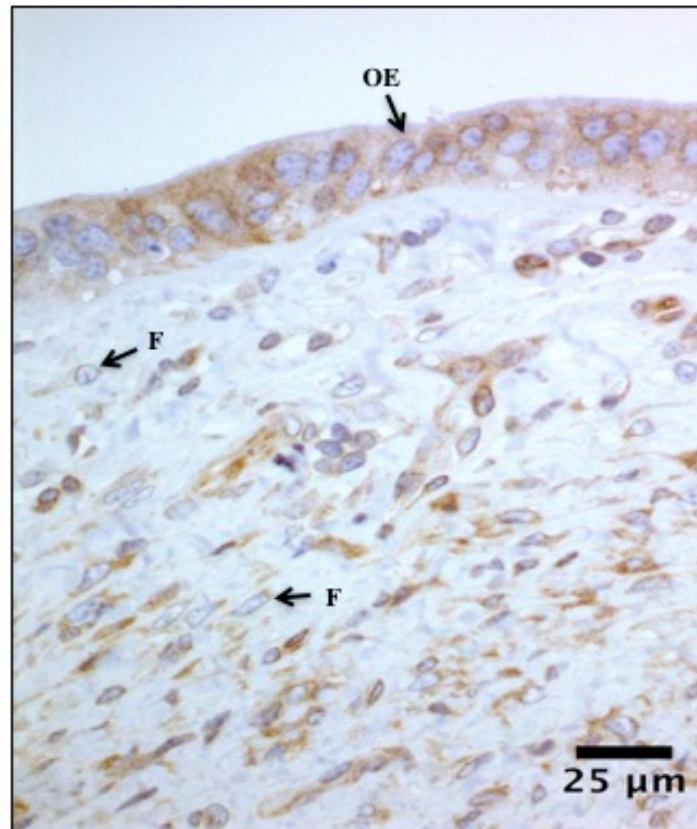


Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC2 im oberflächlichen bovinen Endometrium, 7. Monat der Trächtigkeit

OE: Oberflächenepithel; F: Fibroblast

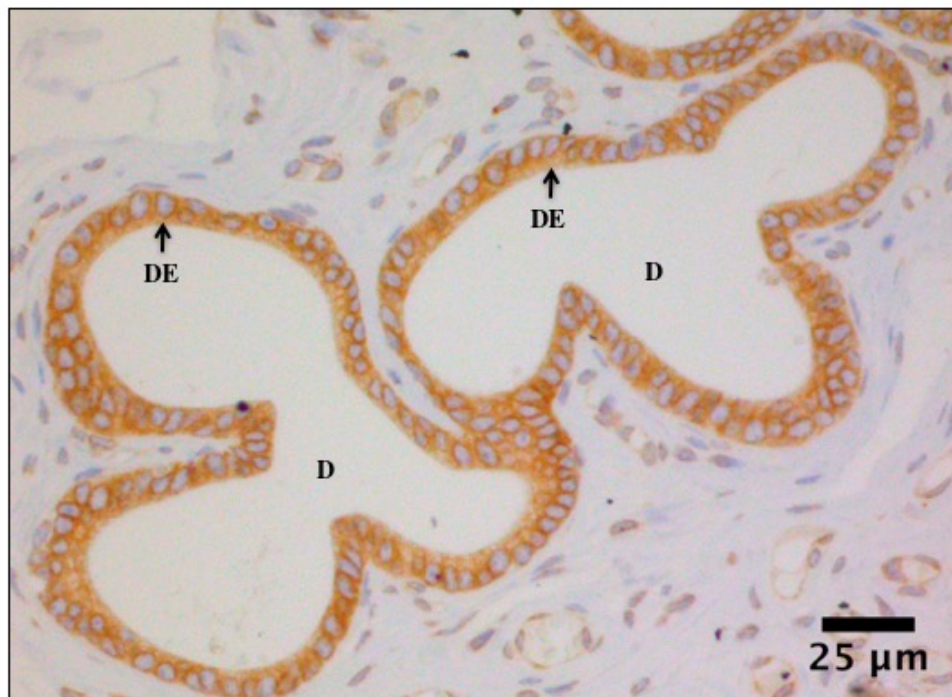


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC2 im tiefen bovinen Endometrium, 1. Monat der Trächtigkeit

D: Drüse; DE: Drüsenepithel

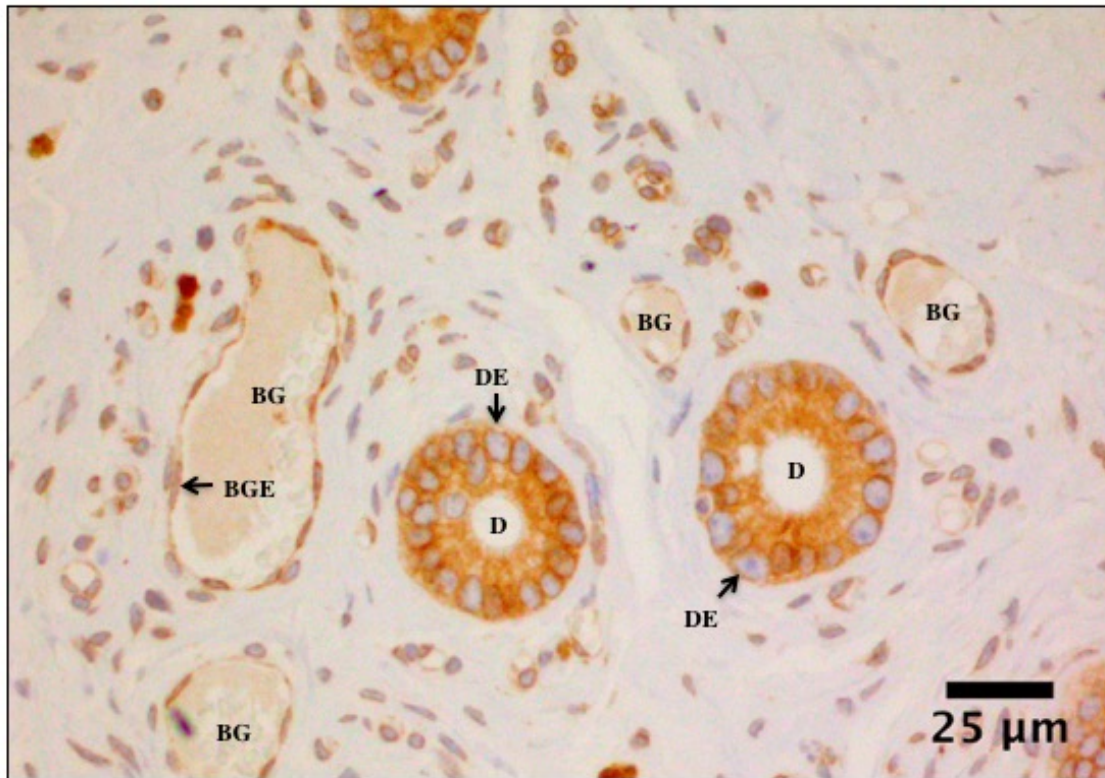


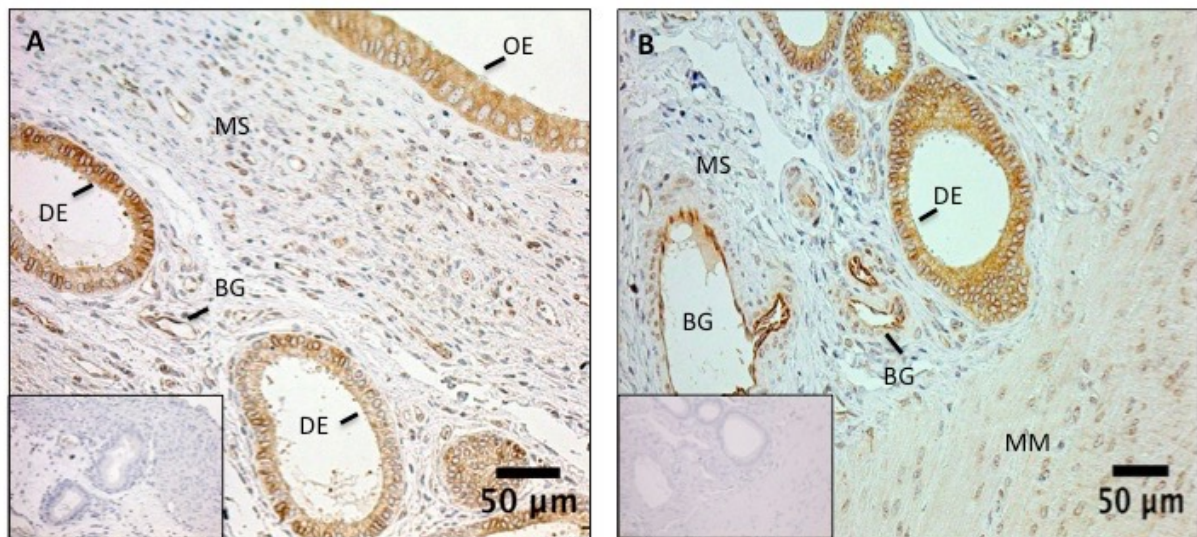
Abbildung 23: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC2 im bovinen Endometrium, 1. Monat der Trächtigkeit

D: Drüse; DE: Drüsenepithel; BG: Blutgefäß; BGE: Blutgefäßendothel

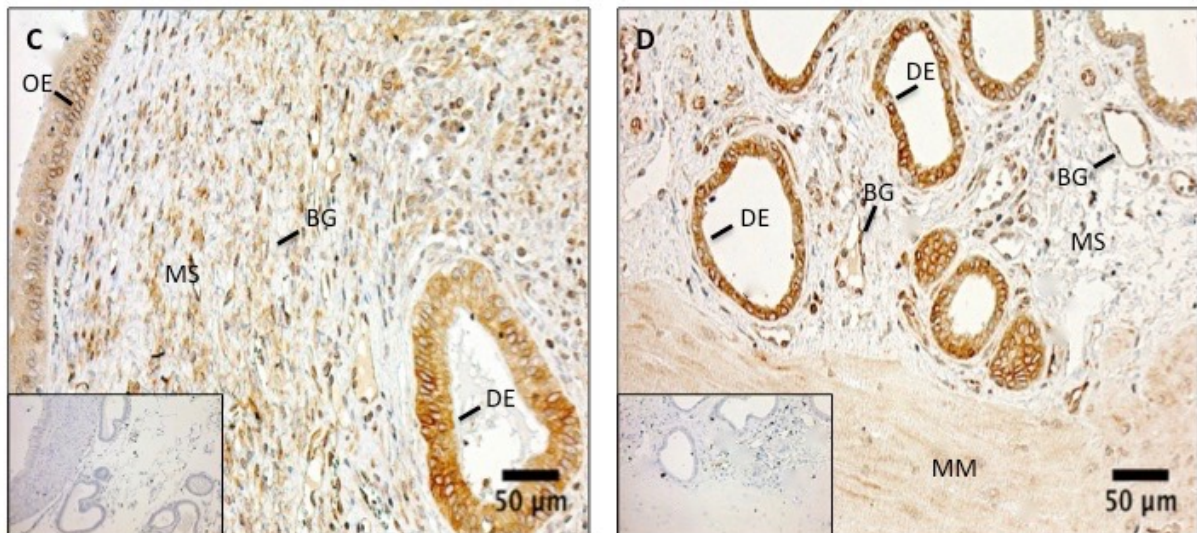


Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC2 im Myometrium, 1. Monat der Trächtigkeit

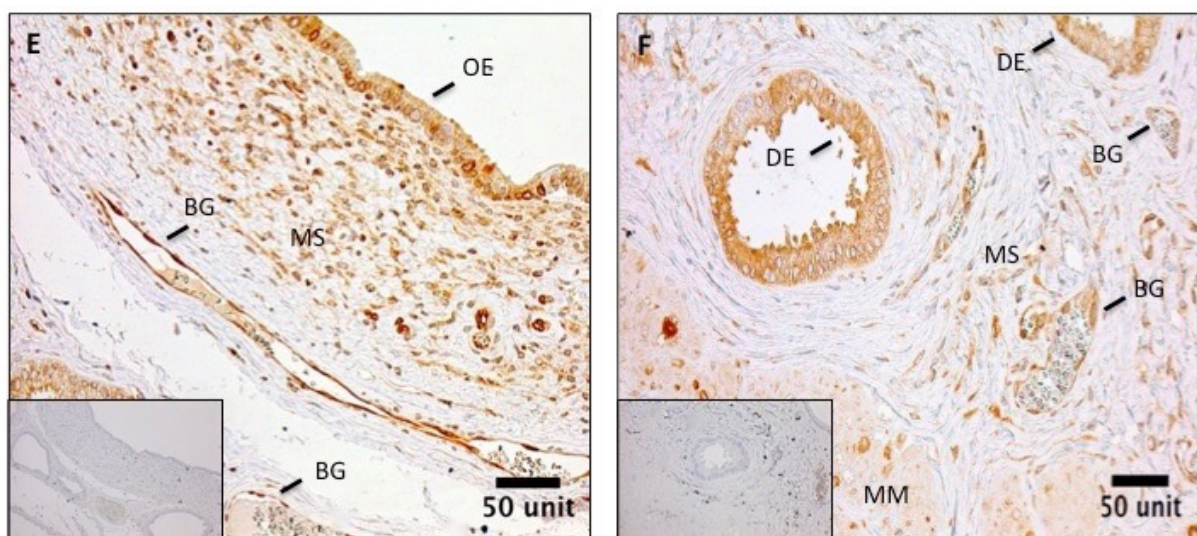
GMZ: glatte Muskelzelle; BG: Blutgefäße



3. Monat



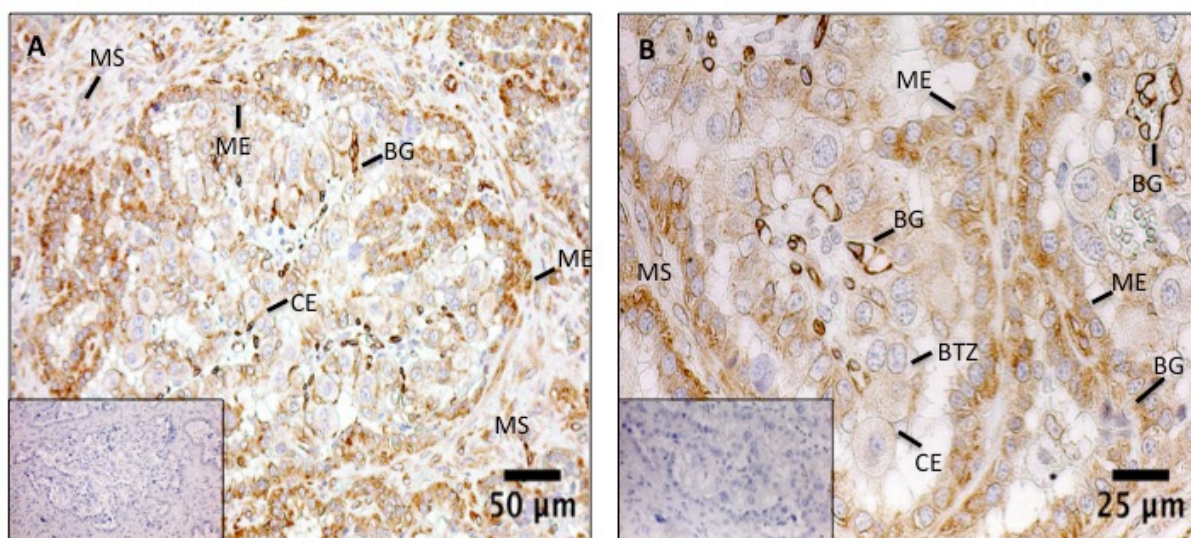
6. Monat



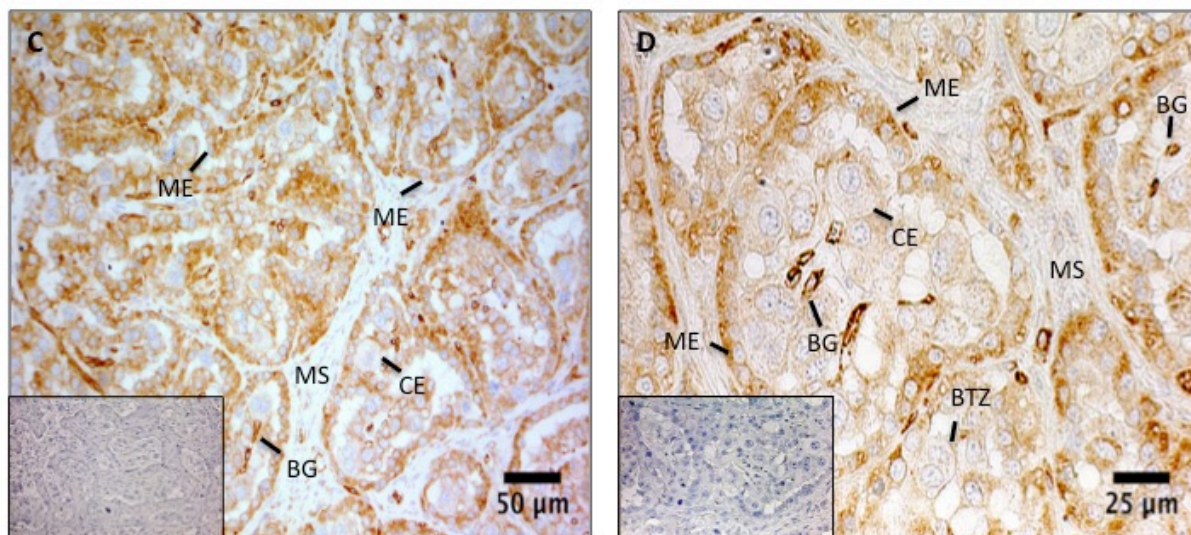
9. Monat

Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC2 in der bovinen Uteruswand während der Trächtigkeit

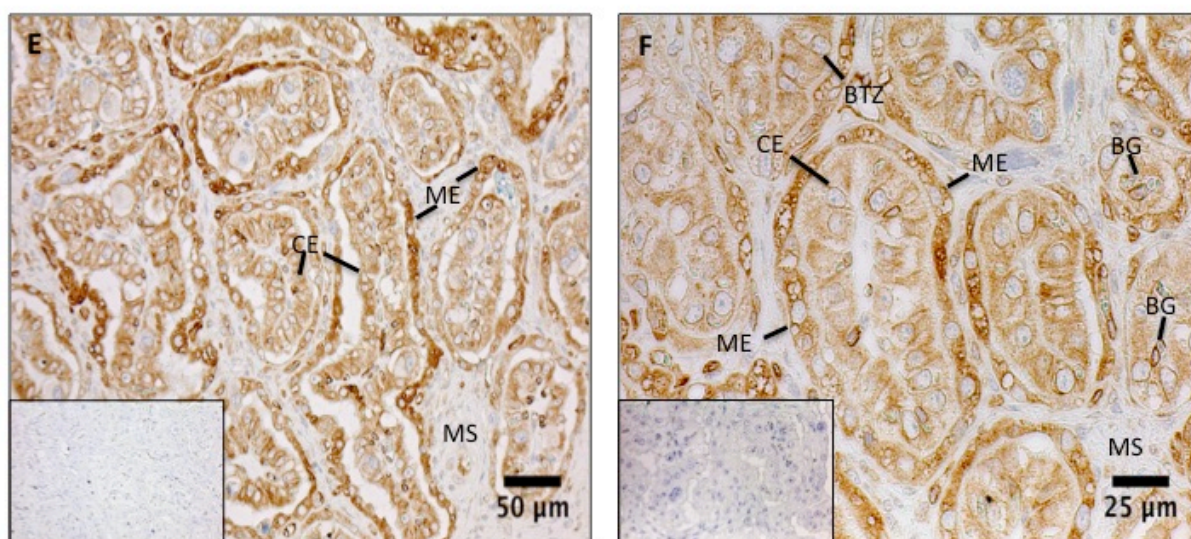
OE: Oberflächenepithel; DE: Drüsenepithel; MS: maternales Stroma; MM: Myometrium; BG: Blutgefäße; Inlays: Isotypenkontrolle; A, B: 3., C, D: 6. und E, F: 9. Monat der Trächtigkeit



3. Monat



6. Monat



9. Monat

Abbildung 26: Immunhistochemischer Nachweis von PGRMC2 im bovinen Plazentom während der Trächtigkeit

ME: maternales Epithel; CE: fetales Chorionepithel; MS: maternales Stroma; BTZ: binukleäre Trophoblastzelle; BG: maternale und fetale Blutgefäße; Inlays: Isotypenkontrolle; A, B: 3., C, D: 6. und E, F: 9. Monat der Trächtigkeit

6.3 Vergleich der Expression und zellulären Lokalisation von PGRMC1 und PGRMC2

PGRMC1 und PGRMC2 zeigen beide eine relativ konstante mRNA- und Proteinausprägung in der bovinen Uteruswand und der Plazenta über den gesamten Trächtigkeitsverlauf, ohne signifikante Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen den einzelnen Monaten der Gravidität aufzuzeigen. Bezüglich der zellulären Lokalisation zeigen beide Proteine ein ähnliches Verteilungsmuster: eine starke Präsenz ist im Zytoplasma der Endothelzellen der maternalen und fetalen Blutgefäße, der glandulären Epithelzellen und des Oberflächenepithels des Endometriums zu verzeichnen. Ein wesentlicher Unterschied findet sich jedoch im fetalen Chorionepithel: hier kommt PGRMC2 in uni- und binukleären Trophoblastzellen vor, wohingegen PGRMC1 in beiden Zelltypen vollständig fehlt.

7 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie war es mittels verschiedener Techniken die beiden potenziellen, nicht klassischen Progesteronrezeptoren PGRMC1 und PGRMC2 im graviden Uterus des Rindes nachzuweisen und ihre Verteilung über den gesamten Verlauf der Trächtigkeit (1.- 9. Trächtigkeitsmonat) zu dokumentieren. Hierbei fanden die interplazentomäre Uteruswand und das Plazentom von Schlachtrindern aus verschiedenen Stadien der Gravidität getrennte Berücksichtigung. Auf Ebene der mRNA- und Proteinexpression wurde eine semi-quantitative Real-Time-PCR und der Western Blot eingesetzt. Die zelluläre Lokalisation wurde anhand immunhistochemischer Verfahren evaluiert. Mit diesen Untersuchungen sollte ein umfassendes Bild über das Vorkommen und das Verteilungsmuster dieser potentiellen Rezeptoren im bovinen Uterus und der Plazenta geschaffen werden. Dieses soll zum einen Anschluss bieten an Studien der Arbeitsgruppen von Kowalik et al. (Kowalik and Kotwica, 2008; Kowalik et al., 2013b; Kowalik et al., 2014) (Slonina et al., 2012) und Luciano et al. (Luciano et al., 2011), die die Expression der PGRMCs innerhalb des Östruszyklus und während der frühen Trächtigkeit im Uterus bereits untersucht haben, und zum anderen ein Vergleich mit dem Expressionsmuster des nuklearen Progesteronrezeptors bieten, welches Boos et al. und Schuler et al. in früheren Studien ausführlich in der Uteruswand und im Plazentom aufgezeigt haben (Boos et al., 1996; Schuler et al., 1999; Boos et al., 2003a; Boos et al., 2006). In der vorliegenden Studie konnte neben dem Nachweis der durchgängigen Präsenz beider PGRMCs in den untersuchten Strukturen aller evaluierten Trächtigkeitsstadien, ein gewebs- und zellspezifisches Verteilungsmuster der beiden Proteine nachgewiesen werden.

7.1 Methodik

7.1.1 Probenmaterial

Das verwendete Probenmaterial von Uteruswand und Plazenta stammte von frisch getöteten Schlachtrindern aus unterschiedlichen Trächtigkeitsstadien (n= 5 Tiere / Trächtigkeitsmonat). Die Vergleichbarkeit dieser Schlachtrinder ist nur bedingt möglich, da keine Informationen über Alter, Rasse, Haltungsbedingungen und Parität vorliegen und auch der Grund für die Schlachtung sowie eventuelle Vorerkrankungen nicht eruiert werden konnten. Daher ist es möglich, dass die Gruppe der verwendeten Tiere recht inhomogen ist. Besser, aber aus wirtschaftlichen und ethischen Gründen nur sehr schwer realisierbar, wäre es gewesen, gesunde Tiere nur einer Rasse mit gleichem Paritätsstatus aus derselben Herde und unter

identischen Haltungsbedingungen zu nutzen. Aufgrund der grossen individuellen Streuung in der mRNA- und Proteinexpression hätte man eventuell mit einem grösseren Stichprobenumfang arbeiten sollen, da die genutzte Tierzahl von $n = 5$ Tiere/Trächtigkeitsmonat insgesamt doch recht gering ist. Limitierender Faktor bei der Probensammlung ist vor allem die Tatsache, dass Tiere in der fortgeschrittenen Trächtigkeit nur selten geschlachtet werden und somit der damit verbundene finanzielle und vor allem zeitliche Aufwand in Relation zum Ertrag - ausreichend grosse, repräsentative Stichproben - gesetzt werden muss.

7.1.2 Bestimmung des Trächtigkeitsalters

Da die Vorgeschichte und damit der Zeitpunkt der Belegung der verwendeten Rinder fehlte, wurde das Trächtigkeitsalter, beziehungsweise das Alter der Föten anhand der Messung der Scheitel-Steiß-Länge der Früchte und anschließender Berechnung mit der Formel nach Keller (s. Schnorr and Kressin, 2011) ermittelt. Hierbei ist zum einen zu beachten, dass die manuelle Messung immer von menschlichen Fehlern beeinflusst sein kann und es zum anderen zu deutlichen Größenunterschieden bei Feten aufgrund unterschiedlicher Rassen, unterschiedlichem Geschlecht und eventuellen Fehlbildungen, beziehungsweise krankheitsbedingten Wachstumsverzögerungen oder -zunahmen kommen kann, welche die Ermittlung des Trächtigkeitsalters zu beeinflussen vermögen. Auch hier wäre für die Vergleichbarkeit der Trächtigkeitsstadien eine homogene Tiergruppe, zumindest derselben Rasse, von Vorteil gewesen, um eventuelle Fehlmessungen und damit die Zuordnung zu einem falschen Trächtigkeitsmonat vorzubeugen.

7.1.3 Verwendete Analysemethoden

Alle drei verwendeten Verfahren sind seit langem im Institut etabliert und wurden nach bereits früher mehrfach publizierten Protokollen durchgeführt. Um möglichen Schwankungen durch Temperaturunterschiede sowie verschiedene Chargen von Puffern, Lösungen und Reagenzien zu vermeiden, wurden die jeweiligen Versuchsserien zeitnah und mit denselben Chargen an Verbrauchsmaterialien durchgeführt.

7.2 Nachweis von PGRMC1 und PGRMC2 in der interplazentomären Uteruswand

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die mRNA und die Proteine von PGRMC1 und PGRMC2 in der interplazentomären Uteruswand durchgehend und relativ konstant während der Trächtigkeit präsent sind. Die Beobachtung, dass sich keine signifikanten Unterschiede, weder in der mRNA- noch in der Proteinexpression, zwischen den einzelnen Trächtigkeitsmonaten ergab, deckt sich mit der Untersuchung dieser Rezeptoren im Endometrium (Kowalik et al., 2013b) und von PGRMC1 im Myometrium (Slonina et al., 2012) innerhalb der ersten 12 Wochen der Trächtigkeit. Von diesen Autoren wurden zwar sowohl im Endometrium als auch im Myometrium eine signifikante Differenz zwischen dem Östruszyklus mit niedrigeren Werten gegenüber der Trächtigkeit mit höheren Werten nachgewiesen, aber zwischen den einzelnen Trächtigkeitsphasen (3.-5., 6.-8. und 9. -12. Trächtigkeitswoche) waren keine Unterschiede in der mRNA-Expression zu beobachten. Zusätzlich wurde in diesen beiden Studien auch der nukleäre Progesteronrezeptor untersucht. Interessant hierbei war, dass die mRNA- und die Proteinexpression im Endometrium beider Isoformen des nukleären PGRs signifikant niedriger in der Trächtigkeit gegenüber dem Östruszyklus war. Im Myometrium hingegen war, wie bei PGRMC1, eine signifikant höhere Menge an PGRs in der Trächtigkeit zu vermerken. Die Ergebnisse der mRNA- und Proteinexpression von PGRMC1 und PGRMC2 in dieser Studie sowie in denen von Kowalik et al. und Slonina et al. lassen vermuten, dass diese beiden nicht-genomischen Progesteronrezeptoren neben dem klassischen nukleären PGR eine entscheidende Rolle bei der endokrinen Regulation der Trächtigkeit des Rindes spielen (Slonina et al., 2012; Kowalik et al., 2013b). Vor allem im Endometrium scheinen sie durch ihre erhöhte Expression, im Gegensatz zu der des nukleären PGRs, wichtige, nicht-genomische Funktionen in der Trächtigkeit zu übernehmen.

Auch der dritte Teil der vorliegenden Studie, der immunhistochemische Nachweis von PGRMC1 und PGRMC2 in der interplazentomären Uteruswand untermauert die oben genannten Beobachtungen. In allen neun untersuchten Trächtigkeitsmonaten war die immunhistochemische Reaktion deutlich erkennbar und es wurden keine Differenzen in der Färbeintensität oder der zellulären Lokalisation innerhalb der Gravidität beobachtet. Beide Rezeptoren kommen innerhalb des Zytoplasmas endometrialer Oberflächenepithel-, Drüsenepithel- und Stromazellen sowie Endothelzellen der Blutgefäße vor. Ferner sind sie auch in den glatten Muskelzellen des Myometriums und den Endothelzellen der Blutgefäße nachweisbar. Diese Ergebnisse bezüglich PGRMC1 decken sich mit denen einer Studie über

dessen zelluläre Lokalisation im bovinen Reproduktionstrakt während des Östruszyklus (Luciano et al., 2011). Es wurde PGRMC1 ohne Variationen innerhalb des Zyklus im Oberflächenepithel, im Drüsenepithel und in den Endothelzellen der Blutgefäße nachgewiesen. Zu der zellulären Lokalisation von PGRMC2 innerhalb des Uterus des Rindes gibt es nach Recherche der vorliegenden Literatur derzeit keine Studien. Keator et al. haben in ihrer Arbeit am zyklischen Endometrium von Makaken gezeigt, dass PGRMC2 im Oberflächenepithel, Drüsenepithel, Stroma und vereinzelt mit schwächerer Ausprägung in den Endothelzellen der Blutgefäße vorhanden ist (Keator et al., 2012). Dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein. Im Vergleich mit dem nukleären PGR lassen sich auch bei der zellulären Lokalisation Unterschiede feststellen. In einer Studie über die Verteilung der PGRs innerhalb der interplazentomären Uteruswand während der Trächtigkeit beim Rind von Boos et al., konnte gezeigt werden, dass die PGRs zwar relativ konstant im endometrialen Stroma, im Drüsenepithel und in den glatten Muskelzellen des Myometriums während der Gravidität vorkommen, aber im endometrialen Oberflächenepithel völlig fehlen (Boos et al., 2006). Zusätzlich nahm die generell schwache Färbungsintensität der Drüsenkörper nach dem ersten Trimester zum Ende der Trächtigkeit weiterhin ab. Die Entdeckung, dass der PGR im Oberflächenepithel des Endometriums innerhalb der Trächtigkeit gegenüber dem Zyklus fehlt, deckt sich mit der Beobachtung von Kowalik et al., dass die mRNA- und Protein Expression im Endometrium in der frühen Gravidität signifikant sinkt im Vergleich zum Östruszyklus (Kowalik et al., 2013b).

Diese und frühere Studien lassen sowohl durch das Vorkommen, als auch die gewebe- und zellspezifische Lokalisation von PGRMC1 und PGRMC2 vermuten, dass sie in die Vermittlung von nicht-genomischen Progesteroneffekten in bestimmten Zielstrukturen im graviden Uterus des Rindes involviert sind.

7.2.1 PGRMC1 und PGRMC2 im bovinen Myometrium

Während der Trächtigkeit ist die Ruhigstellung des Myometriums von essentieller Wichtigkeit für deren komplikationslose Aufrechterhaltung. Wie bereits seit langem bekannt, wird die Verhinderung der myometrialen Kontraktionen durch Progesteron erreicht. Durch die Wirkung des Progesterons führen unterschiedliche Mechanismen, wie die Veränderung der intrazellulären Kalziumkonzentration und der Konzentrationen von Prostaglandinen, Relaxin und Oxytocin zur Relaxation des Myometriums (Graham and Clarke, 1997). Andere Autoren konnten zeigen, dass Progesteron die Bindung von Oxytocin an seinen Rezeptor über einen nicht-genomischen Weg hemmt (Grazzini et al., 1998). Die Arbeitsgruppe von Kowalik

zeigte im bovinen Endometrium, dass es durch die verminderte Oxytocinbindung zu einer Verringerung des intrazellulären Kalziumlevels und zu einer verminderten Sekretion von Prostaglandin F2 α kommt (Duras et al., 2005; Slonina et al., 2009). Die in der vorliegenden Studie nachgewiesene konstante Präsenz von PGRMC1 und PGRMC2 innerhalb der glatten Muskelzellen in der Muskelhaut des Uterus lässt deshalb vermuten, dass sie neben den nukleären PGR für die Ruhigstellung des Myometriums während der Gravidität des Rindes mitverantwortlich sein könnten. Diese Vermutung bestätigten Wu et al. mit ihrer Studie über PGRMC1, in der sie zeigten, dass PGRMC1 innerhalb des humanen Myometriums dessen Kontraktilität hemmt und die Verminderung der PGRMC1-Konzentration je nach Zeitpunkt zu termingerechten beziehungsweise frühzeitigen Wehen führte (Wu et al., 2011). Die Beobachtung dieser Autoren, dass PGRMC1 zum Zeitpunkt der Geburt im humanen Uterus vermindert ist, konnte in der vorliegenden Studie allerdings nicht gezeigt werden. Obwohl es zu erwarten gewesen wäre, dass zum Ende der Trächtigkeit, die mRNA- und Proteinlevels von PGRMC1 aufgrund der Vorbereitung auf die nahende Geburt sinken würden, kam es zu keinen Veränderungen bei den hier untersuchten Tieren während des neunten Monats. Der Grund dafür könnte darin liegen, dass in die hier vorliegende Studie einbezogenen Kühe einerseits noch nicht nah genug am Geburtszeitpunkt waren oder es beim Rind andererseits zu keinem Abfall von PGRMC1 zum Zeitpunkt kurz vor oder unter der Geburt kommt. Weitere Untersuchungen zu diesem Aspekt sind erforderlich.

7.2.2 PGRMC1 und PGRMC2 im bovinen Endometrium

7.2.2.1 Endometriales Oberflächenepithel

Im Gegensatz zum nukleären PGR (Boos et al., 2006) kommen beim hier beschriebenen immunhistochemischen Nachweis PGRMC1 und PGRMC2 mit sehr hoher Reaktionsintensität im endometrialen Oberflächenepithel während der gesamten Gravidität vor. Dies lässt auf eine nicht-genomisch vermittelte Progesteronantwort innerhalb dieser Zellen vermuten. Im Endometrium spielt Progesteron bei der Proliferation und Differenzierung der Zellen des Oberflächenepithels im Hinblick auf die Vorbereitung der Implantation eine wichtige Rolle (Graham and Clarke, 1997). Dadurch, dass bei vielen Spezies der nukleäre PGR zum Zeitpunkt der Trächtigkeit nicht mehr im Oberflächenepithel des Endometriums vorhanden ist, wurde angenommen, dass die direkte Progesteronwirkung durch eine indirekte Wirkung über parakrin vermittelte Mechanismen nach der Bindung von Progesteron an PGRs innerhalb der naheliegenden Stromazellen ersetzt wird (Spencer and

Bazer, 2002; Cunha et al., 2004; Spencer et al., 2004). Durch die Ergebnisse dieser Studie ergeben sich jedoch deutliche Hinweise, dass die Progesteroneffekte auf das PGR-negative endometriale Oberflächenepithel anstatt, beziehungsweise zusätzlich zum parakrinen Mechanismus, auch direkt durch die nicht-genomischen Progesteronrezeptoren PGRMC1 und PGRMC2 vermittelt werden könnten.

7.2.2.2 Endometriales Stroma

Im endometrialen Stroma waren PGRMC1 und PGRMC2 in dieser Studie in allen Phasen der Trächtigkeit vorhanden. Es ist anzunehmen, dass sie, wie auch die nukleären PGR, die laut anderen Studien ebenfalls während der gesamten Trächtigkeit beim Rind im Stroma vorhanden sind (Boos et al., 2006), spezifische Effekte von Progesteron in diesem Gewebe direkt vermitteln. Die Stromazellen sind also möglicherweise in der Lage unterschiedlich, durch genomische und nicht-genomische Mechanismen, auf den hormonellen Reiz des Progesterons zu reagieren.

7.2.2.3 Drüsenepithel

Da in der vorliegenden Studie sowohl PGRMC1 als auch PGRMC2 in allen Monaten der Trächtigkeit eine hohe Intensität der Immunreaktion in den Epithelzellen der oberflächlichen und tiefen Drüsen zeigten, ist anzunehmen, dass sie in hohem Masse an der durch Progesteron stimulierten Sekretion der Uterinmilch beteiligt sind. Boos et al. hatten in ihrer Studie vermutet, dass aufgrund des sehr geringen Vorkommens des nukleären PGR innerhalb der uterinen Drüsen und der damit fehlenden direkten Einwirkung des Progesterons, die Drüsen indirekt durch Progesteron zur Sekretion stimuliert werden könnten (Schäubli, 2005; Boos et al., 2006; Schaubli et al., 2008). Diese Vermutung wurde durch eine Studie von Cunha et al. im Uterus von Mäusen unterstützt, in der nachgewiesen wurde, dass Progesteron parakrin auf Zellen einwirken kann, welche keine PGR besitzen (Cunha et al., 2004; Schäubli, 2005; Schaubli et al., 2008). Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann vermutet werden, dass im bovinen Uterus die Progesteron-induzierte Sekretionstätigkeit der endometrialen Drüsen während der Trächtigkeit auch durch die nicht-genomischen Progesteronrezeptoren PGRMC1 und PGRMC2 vermittelt wird.

7.2.3 PGRMC1 und PGRMC2 in Endothelzellen der myometrialen und endometrialen Blutgefäße

PGRMC1 und PGRMC2 zeigten in dieser Untersuchung eine starke Präsenz in den Endothelzellen der Blutgefäße sowohl im bovinen Endometrium als auch im Myometrium in allen untersuchten Stadien der Trächtigkeit. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Slonina et al. und Luciano et al. überein, die PGRMC1 ebenfalls in den Endothelien der uterinen Blutgefäße während des Östruszyklus beim Rind nachgewiesen haben (Luciano et al., 2011; Slonina et al., 2012; Kowalik et al., 2013a). Auch PGRMC2 wurde bereits in den Endothelzellen der endometrialen Blutgefäße von Makaken identifiziert (Keator et al., 2012). Die dominante Anwesenheit dieser beiden Rezeptoren in den Blutgefäßen des Endometriums und Myometriums deutet darauf hin, dass sie eventuell am nicht-genomischen Progesteroneffekt auf die uterinen Blutgefäße teilnehmen und somit den uterinen Blutfluss beeinflussen. Diese Annahme wird unterstützt durch mehrere Studien, die zeigen das Progesteron durch schnelle, somit nicht-genomische Effekte Einfluss auf den Blutgefäßtonus nimmt (Ramirez et al., 1998; Simoncini et al., 2004; Thomas and Pang, 2013). In der 2002 veröffentlichten Studie von Minshall et al. wird gezeigt, dass es in den glatten Muskelzellen der Koronararterien von Primaten durch Progesteron zu einer schnellen, über einen nicht-genomischen Mechanismus vermittelten Vasodilatation und in deren Folge zur Senkung des Blutdrucks kommt (Minshall et al., 2002). Auch in einer Untersuchung von Barbagallo et al. konnte gezeigt werden, dass Progesteron ein vasoaktives Hormon ist und vermutlich in den glatten Muskelzellen durch seine kalziumabhängigen, vasodilatierenden Effekte direkten Einfluss auf den Gefäßtonus im Uterus während der Gravidität ausübt. Durch die fehlende Latenzzeit der Progesteroneffekte auf die Blutgefäße schlossen auch diese Autoren eine genomische Progesteronantwort weitestgehend aus (Barbagallo et al., 2001). Dass Progesteron auch über die Endothelzellen der Blutgefäße einen schnellen, nicht-genomischen vasodilatatorischen Effekt auslösen kann, wird anhand der Tatsache, dass Endothelzellen einer der Hauptbildungsstellen für die Stickstoffmonoxid(NO)-Synthese sind, deutlich (Thomas and Pang, 2013). Progesteron kann die Aktivität des Enzyms für die NO-Bildung, die Endotheliale-NO-Synthase (eNOS), in den Endothelzellen erhöhen und damit eine gesteigerte NO-Synthese auslösen (Ross et al., 2008; Thomas and Pang, 2013) (Selles et al., 2001). Da NO eine direkte relaxierende Wirkung auf die benachbarten glatten Muskelzellen ausübt, wirkt es als potenter Aktivator der Dilatation der Blutgefäße (Mueck and Seeger, 2009; Zhang et al., 2011; Thomas and Pang, 2013). Allerdings wurde in diesen Studien nicht ermittelt, welche Rezeptoren für diese schnellen, nicht-genomischen Effekte verantwortlich

sind (Thomas and Pang, 2013). Es bleibt also nur eine Vermutung, dass anhand der in dieser Studie gefunden Lokalisation von PGRMC1 und PGRMC2 in den Endothelien der Blutgefäße, diese auch tatsächlich eine Rolle bei der Regulation des uterinen Blutflusses spielen dürften.

7.3 Nachweis von PGRMC1 und PGRMC2 im Plazentom

Bei den hier vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die mRNA als auch die Proteine von PGRMC1 und PGRMC2 im bovinen Plazentom während aller untersuchten Phasen der Trächtigkeit relativ konstant exprimiert sind. In der aktuellen Literatur sind keine Studien über die mRNA-Expression dieser beiden Rezeptoren in der bovinen Plazenta zu finden. Bezüglich der menschlichen Plazenta existiert eine Studie von Zachariades et al., in der unter anderem die mRNA-Expression von PGRMC1 in der Plazenta von Frauen vor der 37. Schwangerschaftswoche (SSW), mit placentarem Gewebe von Frauen, welche sich um den Geburtstermin (>37. SSW) befanden, verglichen wurden. Es zeigte sich eine etwas niedrigere mRNA-Expression bei Frauen vor der 37. SSW gegenüber denen nach der 37. SSW (Zachariades et al., 2012). Einen solchen Befund konnten wir in unserer Studie nicht beobachten. Es zeigten sich keine signifikanten Variationen zwischen den Tieren vor dem neunten, gegenüber Tieren im neunten Trächtigkeitsmonat. Shankar et al. entdeckten in ihrer Studie über Molekularmarker für frühzeitige Wehen in der menschlichen Choriodezidua eine veränderte PGRMC2-Expression bei Frauen die davon betroffen waren. In ihrer Proteomics-Untersuchung verglichen sie das Choriodeziduagewebe von Frauen die vor der 35. SSW spontane, frühzeitige Wehen zeigten und gebären mit einer Kontrollgruppe von schwangeren Frauen, die sich nicht in Geburt befanden. Hierbei konnten sie zeigen, dass das Protein PGRMC2 in der Choriodezidua von Frauen mit vorzeitigen Wehen erhöht exprimiert war (Shankar et al., 2010). Neben diesen beiden Studien an der menschlichen Plazenta, welche nur bestimmte Zeiträume der Gravidität beleuchten, ist die vorliegende Studie die erste, die die mRNA- und Proteinexpression von PGRMC1 und PGRMC2 innerhalb der bovinen Plazenta in allen Phasen der Trächtigkeit zum Gegenstand hat. In den weiteren Untersuchungen über die zelluläre Lokalisation dieser beiden Proteine innerhalb der bovinen Plazenta konnte hiermit gezeigt werden, dass beide PGRMCs durchgängig in allen Phasen der Trächtigkeit im Zytoplasma der maternalen Stromazellen und des maternalen Epithels der Plazentome vorhanden waren. Zusätzlich zeigten sich beide PGRMCs in den Endothelzellen der maternalen und fetalen Blutgefäße und PGRMC2 liess sich zusätzlich innerhalb des

fetalen Chorionepithels detektieren. Aus Mangel an Studien mit immunhistochemischem Nachweis in der bovinen Plazenta, kann hier kein Vergleich gezogen werden. In der humanen Plazenta allerdings wurde gezeigt, dass PGRMC1 im Zytoplasma der Zellen des Chorions und des Amnions stärker präsent war als im Zytoplasma der Dezidualzellen (Feng et al., 2014). Ähnliche Beobachtungen machten Zhang et al. mit ihrer Studie zu PGRMC1 in uterinem und plazentarem Gewebe von Menschen und Mäusen. Innerhalb der Mäuseplazenta befand sich PGRMC1 in den Zellen des primären Chorions, des Dottersacks und in den Trophoblastriesenzellen. In der humanen Plazenta wurde PGRMC1 in den glatten Muskelzellen der fetalen Blutgefäße und im Synzytiotrophoblast detektiert (Zhang et al., 2008). Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den hier vorliegenden Beobachtungen, da PGRMC1 im Trophoblasten völlig fehlt. Einzig die Lokalisation von PGRMC1 innerhalb der fetalen Blutgefäße deckt sich mit denen von Zhang et al. in der menschlichen Plazenta, wobei sich auch hier Unterschiede zeigen, in welchem Kompartiment der Gefäßwand PGRMC1 lokalisiert ist. Diese unterschiedlichen Beobachtungen könnten damit zusammenhängen, dass zwischen den hier genannten Spezies Unterschiede in der Art der Plazentation bestehen. Während Maus und Mensch eine Plazenta haemochorialis besitzen, bei der sich das einschichtige Chorionepithel zum Synzytium umwandelt und das Gefäßendothel des maternalen Endometriums zerstört wird, zeigt das Rind einen epitheliochorialen Plazentatyp, in dem alle Schichten der Plazenta erhalten bleiben und der Trophoblast nicht invasiv ist (Luciano et al., 2011; Schnorr and Kressin, 2011). Es lassen sich ferner Unterschiede beim Vergleich mit der zellulären Verteilung des nukleären PGR innerhalb der bovinen Plazentome beobachten. In einer immunhistochemischen Studie wiesen Schuler et al. den nukleären PGR von der Mitte bis zum Ende der Trächtigkeit ausschliesslich im Zellkern von Stromazellen innerhalb der kryptalen Septen des maternalen Plazentaanteils, sowie vereinzelt in vaskulären Perizyten im maternalen Stroma nach. Es zeigten sich fast keine Veränderungen im Expressionsmuster und der Intensität der Immunreaktion während der untersuchten Trächtigkeitsstadien (Schuler et al., 1999). Die zelluläre Lokalisation in den maternalen Stromazellen konnten Boos et al. ebenfalls in ihrer Untersuchung des nukleären PGRs im Plazentom über die gesamte Trächtigkeit und während einer induzierten Geburt beim Rind bestätigen. In dieser Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg des immunreaktiven Scores im letzten Trächtigkeitsdrittel gegenüber der induzierten Geburt und ein Abfall post partum bei gesunden Tieren ohne Nachgeburtshaltung (Boos et al., 2000).

Das in der vorliegenden Studie gezeigte, konstante Vorkommen und das spezifische zelluläre Verteilungsmuster von PGRMC1 und PGRMC2 innerhalb des bovinen Plazentoms während

der gesamten Trächtigkeit zeigt zum einen, dass sowohl der maternale als auch der fetale Anteil des bovinen Plazentoms Zielstrukturen des Progesterons sind und zum anderen, dass eine eventuelle Teilnahme der beiden Proteine an der Vermittlung der schnellen, nicht-genomischen Progesteroneffekte in den Zielstrukturen vermutet werden kann. Gerade durch die Unterschiede zu anderen Spezies und dem differenzierten Verteilungsmuster des nukleären PGRs des Rindes, scheinen die beiden PGRMCs eine besondere Rolle mit Alleinstellungsmerkmal in der bovinen epitheliochorialen Plazenta einzunehmen.

7.3.1 PGRMC1 und PGRMC2 im maternalen Anteil des Plazentoms

7.3.1.1 Maternales Stroma

Wie auch die nukleären PGRs (Schuler et al., 1999; Boos et al., 2000) kommen PGRMC1 und PGRMC2 in den maternalen Stromazellen des bovinen Plazentoms während der gesamten Gravidität vor. Das bedeutet, dass die maternalen Stromazellen Zielstrukturen für Progesteron sind und die Effekte dieses Hormons innerhalb der Stromazellen sowohl genomisch durch den PGR, als auch nicht-genomisch durch die PGRMCs vermittelt werden können. Folglich kann die maternale Stromazelle sowohl langfristig als auch sehr kurzfristig und schnell auf veränderte Progesteronkonzentrationen im Blut reagieren. Progesteron ist im weitesten Sinne für die Proliferation und Differenzierung der endometrialen Stromazellen mit verantwortlich (Schuler et al., 1999). Eine in vitro Studie von Irwin et al. an humanen Stromazellen des Endometriums zeigte, dass die für Zellwachstum verantwortlichen Wachstumsfaktoren, wie der Epidermal-Growth-Factor (EGF), der Basic-Fibroblast-Growth-Factor (bFGF) und der Platelet-Derived-Growth-Factor, von Progestin, einem synthetischen Progesteronabkömmling, abhängig waren und nur während dessen Anwesenheit ihre Wirkung entfalteten. Auch die Differenzierung der Stromazellen, für die EGF verantwortlich ist, fand nur bei Anwesenheit von Progestin statt (Irwin et al., 1991). Neben der Vermittlung des Progesteroneffekts als potenzielle Progesteronrezeptoren, könnte gerade PGRMC1 hier in der Vermittlung der Wirkung von EGF eine wichtige Rolle spielen, da vermutet wird, dass es verantwortlich für die Lokalisation des EGFR an der zellulären Oberfläche ist und somit für den reibungslosen Verlauf der Bindung von EGF an seinen Rezeptor (Ahmed et al., 2010a). Dies würde eventuell auch erklären, warum PGRMC1 in unserer Studie eine stärkere Immunreaktion im maternalen Stroma als PGRMC2 zeigt.

7.3.1.2 *Maternales Epithel*

In der vorliegenden Studie konnten beide PGRMCs in den Epithelzellen des maternalen Anteils des bovinen Plazentoms während der Trächtigkeit nachgewiesen werden. Progesteron ist auch im maternalen Epithel für die Zellproliferation und -differenzierung verantwortlich (Graham and Clarke, 1997). Da aber der klassische nukleäre PGR in diesen Zellen des bovinen Plazentoms vollständig fehlt (Schuler et al., 1999; Boos et al., 2000), könnten die Effekte von Progesteron möglicherweise durch Interaktion mit PGRMC1 und PGRMC2 vermittelt werden und nicht beziehungsweise nicht ausschliesslich, wie Boos et al. annahmen, durch die parakrine Progesteronwirkung über die benachbarten Stromazellen (Boos et al., 2000).

7.3.2 PGRMC2 im fetalen Anteil des Plazentoms

Der immunhistochemische Nachweis von PGRMC2 in den uninukleären und binukleären Trophoblastzellen des Chorionepithels während der gesamten Gravidität in dieser Studie zeigt, dass auch der fetale Anteil des bovinen Plazentoms nicht nur Produzent (Reimers et al., 1985) sondern auch möglicherweise Zielstruktur von Progesteron ist. Beim Rind ist die Hauptquelle für Progesteron der Gelbkörper (Meyer, 1994). Dieses wird aber zusätzlich auch in den fetalen Kotyledonen, und zwar hauptsächlich von den binukleären Trophoblastriesenzellen synthetisiert (Reimers et al., 1985). Dadurch kann eine Aufrechterhaltung der Trächtigkeit durch plazentomäres Progesteron ungefähr zwischen Tag 150 bis Tag 240 gewährleistet werden (Estergreen et al., 1967; Schuler et al., 1999). Über den Grund, warum PGRMC2 in allen Zellen des bovinen Chorionepithels vorhanden ist, kann nur spekuliert werden. Zum einen könnte es Progesteroneffekte vermitteln, wobei sich hier die Frage stellt, welche Funktion Progesteron in diesen Zellen haben könnte. Zum anderen liesse sich die Hypothese aufstellen, dass PGRMC2, ähnlich wie PGRMC1, an der Steuerung der Cholesterinbiosynthese teilnimmt und somit die Steroidgenese der Trophoblastzellen in den fetalen Kotyledonen reguliert (Zhang et al., 2008; Cahill et al., 2016; Cahill and Medlock, 2017). Da dies aber eine reine Vermutung ist, sind zwingend weitere funktionelle Studien von Nöten um die genaue Funktion von PGRMC2 in den bovinen Trophoblastzellen zu eruieren.

7.3.3 PGRMC1 und PGRMC2 in Endothelzellen der maternalen und fetalen Blutgefässe

PGRMC1 und PGRMC2 wurden in der vorliegenden Studie sowohl in den Endothelzellen der maternalen als auch in denen der fetalen Blutgefässe immunhistochemisch in allen Trächtigkeitsstadien nachgewiesen. Innerhalb der Plazenta haben nur Zhang et al. PGRMC1

in den Blutgefäßen nachgewiesen. In ihrer Studie konnten sie zeigen, dass PGRMC1 in den glatten Muskelzellen der fetalen Arterien und Kapillaren in der humanen Plazenta lokalisiert ist (Zhang et al., 2008). Der nukleäre PGR hingegen wurde von Schuler et al. in den Perizyten der maternalen Blutgefäße im bovinen Plazentom während der zweiten Hälfte der Trächtigkeit nachgewiesen. In den fetalen Blutgefäßen fehlte er jedoch gänzlich (Schuler et al., 1999). Das Vorkommen des nukleären PGRs in den maternalen und der nicht-genomischen PGRMCs in den maternalen und fetalen Blutgefäßen des bovinen Plazentoms, lässt vermuten, dass Progesteron durch indirekte oder direkte Mechanismen möglicherweise in die Angiogenese und in die Regulation des Blutflusses innerhalb der Karunkeln und Kotyledonen involviert ist (Schuler et al., 1999). Die umfangreiche Proliferation der Blutgefäße (Angiogenese) ist besonders wichtig in der Plazenta, da hier der essentielle feto-maternale Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen stattfindet (Ford, 1995). Um den Bedarf des Fötus an Nährstoffen befriedigen zu können, muss durch Dilatation und Ausbau der Blutgefäße der Blutfluss erhöht werden (Ferrell and Ford, 1980; Rosenfeld, 1984; Ferrell, 1991a, 1991b; Ford, 1995). Die Dilatation der Blutgefäße wird maßgeblich durch Progesteron erreicht, welches in den Endothelzellen die eNOS-Aktivität steigert. Dadurch wird die Konzentration des vasoaktiven NO erhöht, was wiederum zu einer erniedrigten intrazellulären Kalziumkonzentration und damit zu einer Relaxation der umliegenden glatten Muskelzellen in den Gefäßen führt (siehe auch 7.2.3) (Thomas and Pang, 2013; Maliqueo et al., 2016). Zusätzlich zu der Veränderung des Blutgefäßtonus wird der Blutfluss durch phasische Kontraktionen der glatten Muskelzellen in der Blutgefäßwand moduliert. Dies geschieht durch Mechanismen die durch die Bindung von Katecholaminen an die $\alpha 1$ -Adrenorezeptoren ausgelöst werden (Ford, 1995). Progesteron wiederum nimmt als einziges Steroidhormon einen positiven Einfluss auf dieses Geschehen, indem es die Konzentration der $\alpha 1$ -Adrenorezeptoren in den uterinen Blutgefäßen erhöht (Ford et al., 1984). So scheint es also möglich, dass PGRMC1 und PGRMC2 die oben genannten Effekte von Progesteron auf die plazentomären Blutgefäße, schnell und auf nicht-genomischen Wege vermitteln könnten. Um ihre genaue Funktion in den Endothelzellen zu ermitteln, bedarf es allerdings dringend weiterführender Studien.

7.4 Schlussfolgerung

Die in der vorliegenden Studie erhaltenen Ergebnisse über die Gen- und Proteinexpression von zwei potenziellen membranständigen Progesteronrezeptoren, PGRMC1 und PGRMC2, im graviden Uterus des Rindes zeigen, dass der hormonelle Botenstoff Progesteron neben dem klassischen nukleären PGR anscheinend weitere Möglichkeiten hat seine Effekte nicht-genomisch und damit vor allem schnell zu vermitteln. In den maternalen Stromazellen, den Epithelzellen der Uterindrüsen und den glatten Muskelzellen des Myometriums, in denen auch der nukleäre PGR zugegen ist, kann durch die Resultate dieser Studie angenommen werden, dass diese Zelltypen zusätzlich zu den langsamen genomischen Veränderungen wohl auch aufgrund der Präsenz der PGRMCs in der Lage sind, sehr schnell auf veränderte Progesteronkonzentrationen zu reagieren. Wo allerdings der nukleäre PGR spärlich exprimiert ist, beziehungsweise gänzlich fehlt, wie zum Beispiel im endometrialen Oberflächenepithel, im Endothel der maternalen und fetalen Blutgefäße sowie im Chorionepithel, ist man durch diese Studie eventuell einen Schritt näher zu verstehen, wie Progesteron auch auf diese Zellen ohne den klassischen PGR einwirken kann. Zusätzlich zum erweiterten Verständnis über das Vorkommen weiterer möglicher Progesteronrezeptoren im graviden Uterus des Rindes, kann diese Studie eine Basis sein für Untersuchungen zur Rolle der PGRMCs bei pathologischen Prozessen und für vergleichende Studien mit anderen Spezies.

7.5 Ausblick

Um das Bild der membranständigen Progesteronrezeptoren zu vervollständigen, braucht es zum einen dringend funktionelle Studien, die den genauen Wirkungsmechanismus der PGRMCs aufdecken und abschließend klären, ob diese Proteine tatsächlich als selbständige Progesteronrezeptoren, oder aber nur als Teil eines Rezeptorkomplexes agieren beziehungsweise als Adapterprotein die Progesteronantwort vermitteln. Zum anderen müsste untersucht werden, ob in diesen Geweben auch noch weitere potenzielle Progesteronrezeptoren ($mPR\alpha$, β , γ) zugegen sind und wenn ja, welche Rolle diese spielen. Außerdem ist es notwendig, die hier vorgestellte Studie mit größeren Tierzahlen zu wiederholen, um zu bestätigen beziehungsweise zu widerlegen, dass keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der PGRMCs zwischen den einzelnen Trächtigkeitsmonaten bestehen. Hierbei wäre es zusätzlich sicher von großem Interesse, das Verhalten der PGRMC-Expression von gesunden Tieren während und nach der Geburt, dem während der Trächtigkeit gegenüberzustellen. Ferner sollten auch pathologische Prozesse, wie der weitverbreiteten Nachgeburtsverhaltung beim Rind oder der Endometriose des Menschen

Berücksichtigung finden. Gerade für die Endometriose existieren bereits Studien bei verschiedenen Primaten sowie beim Menschen, die zeigen, dass sowohl PGRMC1 als auch PGRMC2 ein verändertes Expressionsmuster beim Vorhandensein dieser klinisch bedeutsamen Erkrankung besitzen (Keator et al., 2012; Bunch et al., 2014). Dieses Erkenntnis kann durchaus wichtig sein für das Verständnis der Entwicklung und eventuell auch der Prävention und Therapie dieser Krankheit. Für das Rind stehen allerdings das Verhalten der PGRMCs unter und nach der Geburt sowie bei chronisch entzündlichen Erkrankungen des Uterus als auch der bereits erwähnten Nachgeburtshaltung, im Vordergrund des Interesses.

8 Literaturverzeichnis

- Abid S, Gokral J, Maitra A, Meherji P, Kadam S, Pires E, Modi D. 2008. Altered expression of progesterone receptors in testis of infertile men. *Reprod Biomed Online* 17:175-184.
- Ace CI, Okulicz WC. 2004. Microarray profiling of progesterone-regulated endometrial genes during the rhesus monkey secretory phase. *Reprod Biol Endocrinol* 2:54.
- Ahmed IS, Rohe HJ, Twist KE, Craven RJ. 2010a. Pgrmc1 (progesterone receptor membrane component 1) associates with epidermal growth factor receptor and regulates erlotinib sensitivity. *J Biol Chem* 285:24775-24782.
- Ahmed IS, Rohe HJ, Twist KE, Mattingly MN, Craven RJ. 2010b. Progesterone receptor membrane component 1 (Pgrmc1): a heme-1 domain protein that promotes tumorigenesis and is inhibited by a small molecule. *J Pharmacol Exp Ther* 333:564-573.
- Albers RM. 2007. Morphometrische und stereologische Untersuchungen an der interkarunkulären Uteruswand des Rindes während der Trächtigkeit. In. Zürich. p 58 S.
- Albers RM, Schnapper A, Beyerbach M, Boos A. 2015. Quantitative morphological changes in the interplacentomal wall of the gravid uterine horn of cattle during pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 13:32.
- Albrecht C, Huck V, Wehling M, Wendler A. 2012. In vitro inhibition of SKOV-3 cell migration as a distinctive feature of progesterone receptor membrane component type 2 versus type 1. *Steroids* 77:1543-1550.
- Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1992. Ligand-dependent conformational changes in the progesterone receptor are necessary for events that follow DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11750-11754.
- Aparicio IM, Garcia-Herreros M, O'Shea LC, Hensey C, Lonergan P, Fair T. 2011. Expression, regulation, and function of progesterone receptors in bovine cumulus oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod* 84:910-921.
- Ashley RL, Clay CM, Farmerie TA, Niswender GD, Nett TM. 2006. Cloning and characterization of an ovine intracellular seven transmembrane receptor for progesterone that mediates calcium mobilization. *Endocrinology* 147:4151-4159.
- Atkinson BA, King GJ, Amoroso EC. 1984. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. *Biol Reprod* 30:763-774.

- Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpinski E, Pang PK, Resnick LM. 2001. Vascular Effects of Progesterone : Role of Cellular Calcium Regulation. *Hypertension* 37:142-147.
- Batra SC, Iosif CS. 1987. Progesterone receptors in the female lower urinary tract. *J Urol* 138:1301-1304.
- Beato M, Chavez S, Truss M. 1996. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* 61:240-251.
- Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP. 2004. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:12130-12135.
- Bjorkman N. 1956. Morphological studies on the epithelia of the intercotyledonary component of the bovine placenta. *Acta Morphol Neerl Scand* 1:41-50.
- Bjorkman N, Bloom G. 1957. On the fine structure of the foetal-maternal junction in the bovine placentome. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 45:649-659.
- Bland R. 2000. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci (Lond)* 98:217-240.
- Böck P, Romeis B, Denk H, Böck P. 1989. Romeis, B. *Mikroskopische Technik*, 17., neubearb. Aufl. ed. München etc.: Urban und Schwarzenberg.
- Boos A, Janssen V, Mulling C. 2003a. Proliferation and apoptosis in bovine placentomes during pregnancy and around induced and spontaneous parturition as well as in cows retaining the fetal membranes. *Reproduction* 126:469-480.
- Boos A, Kohtes J, Janssen V, Mulling C, Stelljes A, Zerbe H, Hassig M, Thole HH. 2006. Pregnancy effects on distribution of progesterone receptors, oestrogen receptor alpha, glucocorticoid receptors, Ki-67 antigen and apoptosis in the bovine interplacentomal uterine wall and foetal membranes. *Anim Reprod Sci* 91:55-76.
- Boos A, Kohtes J, Stelljes A, Zerbe H, Thole HH. 2000. Immunohistochemical assessment of progesterone, oestrogen and glucocorticoid receptors in bovine placentomes during pregnancy, induced parturition, and after birth with or without retention of fetal membranes. *J Reprod Fertil* 120:351-360.
- Boos A, Meyer W, Schwarz R, Grunert E. 1996. Immunohistochemical assessment of oestrogen receptor and progesterone receptor distribution in biopsy samples of the bovine endometrium collected throughout the oestrous cycle. *Anim Reprod Sci* 44:11-21.

- Boos A, Stelljes A, Kohtes J. 2003b. Collagen Types I, III and IV in the Placentome and Interplacentomal Maternal and Fetal Tissues in Normal Cows and in Cattle with Retention of Fetal Membranes. *Cells Tissues Organs* 174:170-183.
- Bramley T. 2003. Non-genomic progesterone receptors in the mammalian ovary: some unresolved issues. *Reproduction* 125:3-15.
- Branchini G, Schneider L, Cericatto R, Capp E, Brum IS. 2009. Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas. *Endocrine* 35:459-466.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. 2008. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 29:313-339.
- Bunch K, Tinnemore D, Huff S, Hoffer ZS, Burney RO, Stallings JD. 2014. Expression patterns of progesterone receptor membrane components 1 and 2 in endometria from women with and without endometriosis. *Reprod Sci* 21:190-197.
- Cahill MA. 2007. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *J Steroid Biochem Mol Biol* 105:16-36.
- Cahill MA. 2017. The evolutionary appearance of signaling motifs in PGRMC1. *Biosci Trends*.
- Cahill MA, Jazayeri JA, Catalano SM, Toyokuni S, Kovacevic Z, Richardson DR. 2016. The emerging role of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in cancer biology. *Biochim Biophys Acta*.
- Cahill MA, Medlock AE. 2017. Thoughts on interactions between PGRMC1 and diverse attested and potential hydrophobic ligands. *J Steroid Biochem Mol Biol*.
- Cai Z, Stocco C. 2005. Expression and regulation of progestin membrane receptors in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 146:5522-5532.
- Causey MW, Huston LJ, Harold DM, Charaba CJ, Ippolito DL, Hoffer ZS, Brown TA, Stallings JD. 2011. Transcriptional analysis of novel hormone receptors PGRMC1 and PGRMC2 as potential biomarkers of breast adenocarcinoma staging. *J Surg Res* 171:615-622.
- Charles NJ, Thomas P, Lange CA. 2010. Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells: implications for progesterone-induced signaling events. *Horm Cancer* 1:167-176.

- Chen C, Sargent C, Quilter C, Yang Z, Ren J, Affara N, Brenig B, Huang L. 2010. Cloning, mapping and molecular characterization of porcine progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) gene. *Genet Mol Biol* 33:471-474.
- Cheung J, Smith DF. 2000. Molecular chaperone interactions with steroid receptors: an update. *Mol Endocrinol* 14:939-946.
- Conneely OM, Jericevic BM. 2002. Progesterone regulation of reproductive function through functionally distinct progesterone receptor isoforms. *Rev Endocr Metab Disord* 3:201-209.
- Conneely OM, Lydon JP. 2000. Progesterone receptors in reproduction: functional impact of the A and B isoforms. *Steroids* 65:571-577.
- Conneely OM, Lydon JP, De Mayo F, O'Malley BW. 2000. Reproductive functions of the progesterone receptor. *J Soc Gynecol Investig* 7:S25-32.
- Craven RJ. 2008. PGRMC1: a new biomarker for the estrogen receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res* 10:113.
- Crudden G, Chitti RE, Craven RJ. 2006. Hpr6 (heme-1 domain protein) regulates the susceptibility of cancer cells to chemotherapeutic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 316:448-455.
- Crudden G, Loesel R, Craven RJ. 2005. Overexpression of the cytochrome p450 activator hpr6 (heme-1 domain protein/human progesterone receptor) in tumors. *Tumour Biol* 26:142-146.
- Cunha GR, Cooke PS, Kurita T. 2004. Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* 67:417-434.
- Davies CJ, Fisher PJ, Schlafer DH. 2000. Temporal and regional regulation of major histocompatibility complex class I expression at the bovine uterine/placental interface. *Placenta* 21:194-202.
- Doglioni C, Gambacorta M, Zamboni G, Coggi G, Viale G. 1990. Immunocytochemical localization of progesterone receptors in endocrine cells of the human pancreas. *Am J Pathol* 137:999-1005.
- Dressing GE, Alyea R, Pang Y, Thomas P. 2012. Membrane progesterone receptors (mPRs) mediate progestin induced antimorbidity in breast cancer cells and are expressed in human breast tumors. *Horm Cancer* 3:101-112.
- Dressing GE, Goldberg JE, Charles NJ, Schwertfeger KL, Lange CA. 2011. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids* 76:11-17.

- Duello TM, Byatt JC, Bremel RD. 1986. Immunohistochemical localization of placental lactogen in binucleate cells of bovine placentomes. *Endocrinology* 119:1351-1355.
- Duras M, Mlynarczuk J, Kotwica J. 2005. Non-genomic effect of steroids on oxytocin-stimulated intracellular mobilization of calcium and on prostaglandin F2alpha and E2 secretion from bovine endometrial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 76:105-116.
- Engmann L, Losel R, Wehling M, Peluso JJ. 2006. Progesterone regulation of human granulosa/luteal cell viability by an RU486-independent mechanism. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4962-4968.
- Estergreen VL, Jr., Frost OL, Gomes WR, Erb RE, Bullard JF. 1967. Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. *J Dairy Sci* 50:1293-1295.
- Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Scriba PC, Wehling M. 1996. Full-length cDNA sequence of a progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 229:86-89.
- Falkenstein E, Wehling M. 2000. Nongenomically initiated steroid actions. *Eur J Clin Invest* 30 Suppl 3:51-54.
- Feng L, Antczak BC, Lan L, Grotegut CA, Thompson JL, Allen TK, Murtha AP. 2014. Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) expression in fetal membranes among women with preterm premature rupture of the membranes (PPROM). *Placenta* 35:331-333.
- Ferrell CL. 1991a. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: I. Growth of tissues of the gravid uterus. *J Anim Sci* 69:1945-1953.
- Ferrell CL. 1991b. Maternal and fetal influences on uterine and conceptus development in the cow: II. Blood flow and nutrient flux. *J Anim Sci* 69:1954-1965.
- Ferrell CL, Ford SP. 1980. Blood flow steroid secretion and nutrient uptake of the gravid bovine uterus. *J Anim Sci* 50:1113-1121.
- Ford SP. 1995. Control of blood flow to the gravid uterus of domestic livestock species. *J Anim Sci* 73:1852-1860.
- Ford SP, Reynolds LP, Farley DB, Bhatnagar RK, Van Orden DE. 1984. Interaction of ovarian steroids and periarterial alpha 1-adrenergic receptors in altering uterine blood flow during the estrous cycle of gilts. *Am J Obstet Gynecol* 150:480-484.
- Frye CA, Koonce CJ, Walf AA. 2013. Pregnane xenobiotic receptors and membrane progestin receptors: role in neurosteroid-mediated motivated behaviours. *J Neuroendocrinol* 25:1002-1011.

- Frye CA, Walf AA, Kohtz AS, Zhu Y. 2014. Progesterone-facilitated lordosis of estradiol-primed mice is attenuated by knocking down expression of membrane progestin receptors in the midbrain. *Steroids* 81:17-25.
- Gellersen B, Fernandes MS, Brosens JJ. 2009. Non-genomic progesterone actions in female reproduction. *Hum Reprod Update* 15:119-138.
- Gerdes D, Wehling M, Leube B, Falkenstein E. 1998. Cloning and tissue expression of two putative steroid membrane receptors. *Biol Chem* 379:907-911.
- Giangrande PH, Pollio G, McDonnell DP. 1997. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272:32889-32900.
- Graham JD, Clarke CL. 1997. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-519.
- Graham JD, Clarke CL. 2002. Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res* 4:187-190.
- Gram A, Buchler U, Boos A, Hoffmann B, Kowalewski MP. 2013. Biosynthesis and degradation of canine placental prostaglandins: prepartum changes in expression and function of prostaglandin F2alpha-synthase (PGFS, AKR1C3) and 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (HPGD). *Biol Reprod* 89:2.
- Grazzini E, Guillon G, Mouillac B, Zingg HH. 1998. Inhibition of oxytocin receptor function by direct binding of progesterone. *Nature* 392:509-512.
- Griffin D, Liu X, Pru C, Pru JK, Peluso JJ. 2014. Expression of progesterone receptor membrane component-2 within the immature rat ovary and its role in regulating mitosis and apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells. *Biol Reprod* 91:36.
- Hägström M, Richfield D. 2014. Diagram of the pathways of human steroidogenesis. *WikiJournal of Medicine* 1.
- Hampton KK, Stewart R, Napier D, Claudio PP, Craven RJ. 2015. PGRMC1 Elevation in Multiple Cancers and Essential Role in Stem Cell Survival. *Adv Lung Cancer (Irvine)* 4:37-51.
- Hand RA, Craven RJ. 2003. Hpr6.6 protein mediates cell death from oxidative damage in MCF-7 human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 90:534-547.
- Hirai Y, Utsugi K, Takeshima N, Kawamata Y, Furuta R, Kitagawa T, Kawaguchi T, Hasumi K, Noda T. 2004. Putative gene loci associated with carcinogenesis and metastasis of

- endocervical adenocarcinomas of uterus determined by conventional and array-based CGH. *Am J Obstet Gynecol* 191:1173-1182.
- Horie K, Takakura K, Fujiwara H, Suginami H, Liao S, Mori T. 1992. Immunohistochemical localization of androgen receptor in the human ovary throughout the menstrual cycle in relation to oestrogen and progesterone receptor expression. *Hum Reprod* 7:184-190.
- Hughes AL, Powell DW, Bard M, Eckstein J, Barbuch R, Link AJ, Espenshade PJ. 2007. Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metab* 5:143-149.
- Intlekofer KA, Petersen SL. 2011. Distribution of mRNAs encoding classical progesterin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progesterin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. *Neuroscience* 172:55-65.
- Irwin JC, Utian WH, Eckert RL. 1991. Sex steroids and growth factors differentially regulate the growth and differentiation of cultured human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 129:2385-2392.
- Izzo NJ, Staniszewski A, To L, Fa M, Teich AF, Saeed F, Wostein H, Walko T, 3rd, Vaswani A, Wardius M, Syed Z, Ravenscroft J, Mozzoni K, Silky C, Rehak C, Yurko R, Finn P, Look G, Rishton G, Safferstein H, Miller M, Johanson C, Stopa E, Windisch M, Hutter-Paier B, Shamloo M, Arancio O, LeVine H, 3rd, Catalano SM. 2014a. Alzheimer's therapeutics targeting amyloid beta 1-42 oligomers I: Abeta 42 oligomer binding to specific neuronal receptors is displaced by drug candidates that improve cognitive deficits. *PLoS One* 9:e111898.
- Izzo NJ, Xu J, Zeng C, Kirk MJ, Mozzoni K, Silky C, Rehak C, Yurko R, Look G, Rishton G, Safferstein H, Cruchaga C, Goate A, Cahill MA, Arancio O, Mach RH, Craven R, Head E, LeVine H, 3rd, Spires-Jones TL, Catalano SM. 2014b. Alzheimer's therapeutics targeting amyloid beta 1-42 oligomers II: Sigma-2/PGRMC1 receptors mediate Abeta 42 oligomer binding and synaptotoxicity. *PLoS One* 9:e111899.
- Kabe Y, Yamamoto T, Kajimura M, Sugiura Y, Koike I, Ohmura M, Nakamura T, Tokumoto Y, Tsugawa H, Handa H, Kobayashi T, Suematsu M. 2016. Cystathionine beta-synthase and PGRMC1 as CO sensors. *Free Radic Biol Med* 99:333-344.
- Kaluka D, Batabyal D, Chiang BY, Poulos TL, Yeh SR. 2015. Spectroscopic and mutagenesis studies of human PGRMC1. *Biochemistry* 54:1638-1647.
- Karteris E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS, Thomas P. 2006. Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G

- protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Mol Endocrinol* 20:1519-1534.
- Kayed R, Lasagna-Reeves CA. 2013. Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis* 33 Suppl 1:S67-78.
- Keator CS, Mah K, Slayden OD. 2012. Alterations in progesterone receptor membrane component 2 (PGRMC2) in the endometrium of macaques afflicted with advanced endometriosis. *Mol Hum Reprod* 18:308-319.
- King GJ, Atkinson BA, Robertson HA. 1981. Development of the intercaruncular areas during early gestation and establishment of the bovine placenta. *J Reprod Fertil* 61:469-474.
- König HE, Aurich C. 2012. *Anatomie der Haussäugetiere Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*, 5., überarb. und erw. Aufl. ed. Stuttgart: Schattauer.
- Kowalewski MP, Dyson MT, Manna PR, Stocco DM. 2009. Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in gonadal steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression. *Reprod Fertil Dev* 21:909-922.
- Kowalewski MP, Meyer A, Hoffmann B, Aslan S, Boos A. 2011. Expression and functional implications of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in canine reproductive tissues during normal pregnancy and parturition and at antiprogesterin induced abortion. *Theriogenology* 75:877-886.
- Kowalewski MP, Schuler G, Taubert A, Engel E, Hoffmann B. 2006. Expression of cyclooxygenase 1 and 2 in the canine corpus luteum during diestrus. *Theriogenology* 66:1423-1430.
- Kowalik MK, Kotwica J. 2008. Progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) gene expression in corpus luteum during the estrous cycle in cows. *Reprod Biol* 8:291-297.
- Kowalik MK, Martyniak M, Rekawiecki R, Kotwica J. 2016. Expression and immunolocalization of membrane progesterone receptors in the bovine oviduct. *Domest Anim Endocrinol* 55:83-96.
- Kowalik MK, Rekawiecki R, Kotwica J. 2013a. The putative roles of nuclear and membrane-bound progesterone receptors in the female reproductive tract. *Reprod Biol* 13:279-289.
- Kowalik MK, Rekawiecki R, Kotwica J. 2014. Expression and localization of progesterone receptor membrane component 1 and 2 and serpine mRNA binding protein 1 in the

- bovine corpus luteum during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. *Theriogenology* 82:1086-1093.
- Kowalik MK, Slonina D, Rekawiecki R, Kotwica J. 2013b. Expression of progesterone receptor membrane component (PGRMC) 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1 (SERBP1) and nuclear progesterone receptor (PGR) in the bovine endometrium during the estrous cycle and the first trimester of pregnancy. *Reprod Biol* 13:15-23.
- Krebs CJ, Jarvis ED, Chan J, Lydon JP, Ogawa S, Pfaff DW. 2000. A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:12816-12821.
- Li Y, Marzolo MP, van Kerkhof P, Strous GJ, Bu G. 2000. The YXXL motif, but not the two NPXY motifs, serves as the dominant endocytosis signal for low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 275:17187-17194.
- Liebich H-G, Budras K-D. 2010. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*, 5. Aufl. ed. Stuttgart: Schattauer.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4:357-362.
- Losel R, Breiter S, Seyfert M, Wehling M, Falkenstein E. 2005. Classic and non-classic progesterone receptors are both expressed in human spermatozoa. *Horm Metab Res* 37:10-14.
- Losel R, Dorn-Beineke A, Falkenstein E, Wehling M, Feuring M. 2004. Porcine spermatozoa contain more than one membrane progesterone receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 36:1532-1541.
- Losel R, Wehling M. 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:46-56.
- Losel RM, Besong D, Peluso JJ, Wehling M. 2008. Progesterone receptor membrane component 1--many tasks for a versatile protein. *Steroids* 73:929-934.
- Luciano AM, Corbani D, Lodde V, Tessaro I, Franciosi F, Peluso JJ, Modina S. 2011. Expression of progesterone receptor membrane component-1 in bovine reproductive system during estrous cycle. *Eur J Histochem* 55:e27.
- Luciano AM, Lodde V, Franciosi F, Cecilian F, Peluso JJ. 2010. Progesterone receptor membrane component 1 expression and putative function in bovine oocyte maturation, fertilization, and early embryonic development. *Reproduction* 140:663-672.

- Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266-2278.
- Maliqueo M, Echiburu B, Crisosto N. 2016. Sex Steroids Modulate Uterine-Placental Vasculature: Implications for Obstetrics and Neonatal Outcomes. *Front Physiol* 7:152.
- Mansouri MR, Schuster J, Badhai J, Stattin EL, Losel R, Wehling M, Carlsson B, Hovatta O, Karlstrom PO, Golovleva I, Toniolo D, Bione S, Peluso J, Dahl N. 2008. Alterations in the expression, structure and function of progesterone receptor membrane component-1 (PGRMC1) in premature ovarian failure. *Hum Mol Genet* 17:3776-3783.
- Marsh JM, Butcher RW, Savard K, Sutherland EW. 1966. The stimulatory effect of luteinizing hormone on adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in corpus luteum slices. *J Biol Chem* 241:5436-5440.
- Matamoros RA, Caamano L, Lamb SV, Reimers TJ. 1994. Estrogen production by bovine binucleate and mononucleate trophoblastic cells in vitro. *Biol Reprod* 51:486-492.
- Meinecke B. 2000. Engelhardt, Wolfgang, *Physiologie der Haustiere*. Stuttgart: Enke.
- Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M. 1996. Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem* 239:726-731.
- Meyer HH. 1994. Luteal versus placental progesterone: the situation in the cow, pig and bitch. *Exp Clin Endocrinol* 102:190-192.
- Mifsud W, Bateman A. 2002. Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol* 3:RESEARCH0068.
- Min L, Strushkevich NV, Harnastai IN, Iwamoto H, Gilep AA, Takemori H, Usanov SA, Nonaka Y, Hori H, Vinson GP, Okamoto M. 2005. Molecular identification of adrenal inner zone antigen as a heme-binding protein. *FEBS J* 272:5832-5843.
- Min L, Takemori H, Nonaka Y, Katoh Y, Doi J, Horike N, Osamu H, Raza FS, Vinson GP, Okamoto M. 2004. Characterization of the adrenal-specific antigen IZA (inner zone antigen) and its role in the steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215:143-148.
- Minshall RD, Pavcnik D, Browne DL, Hermismeyer K. 2002. Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. *J Appl Physiol* (1985) 92:701-708.
- Misrahi M, Venencie PY, Saugier-veber P, Sar S, Dessen P, Milgrom E. 1993. Structure of the human progesterone receptor gene. *Biochim Biophys Acta* 1216:289-292.

- Morandell S, Stasyk T, Skvortsov S, Ascher S, Huber LA. 2008. Quantitative proteomics and phosphoproteomics reveal novel insights into complexity and dynamics of the EGFR signaling network. *Proteomics* 8:4383-4401.
- Mueck AO, Seeger H. 2009. Progestogens and target tissues: vascular systems. *Maturitas* 62:356-361.
- Mulac-Jericevic B, Conneely OM. 2004. Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction* 128:139-146.
- Mülhardt C. 2006. <<Der>> Experimentator: Molekularbiologie/Genomics, 5. Auflage ed. München: Elsevier.
- Müller T. 2010. Calcium-Fluxe, Vitamin D-Rezeptoren und Calbindin D9k im Darm des Pferdes. In. Zürich. p 68 S.
- Nakano H, Takahashi T, Imai K, Hashizume K. 2001. Expression of placental lactogen and cytokeratin in bovine placental binucleate cells in culture. *Cell Tissue Res* 303:263-270.
- Neubauer H, Adam G, Seeger H, Mueck AO, Solomayer E, Wallwiener D, Cahill MA, Fehm T. 2009. Membrane-initiated effects of progesterone on proliferation and activation of VEGF in breast cancer cells. *Climacteric* 12:230-239.
- Nilsson EE, Stanfield J, Skinner MK. 2006. Interactions between progesterone and tumor necrosis factor-alpha in the regulation of primordial follicle assembly. *Reproduction* 132:877-886.
- Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW. 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol Rev* 80:1-29.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S, Höfler H. 2000. Praxis der Immunhistochemie. München: Urban und Fischer.
- Nolte I, Jeckel D, Wieland FT, Sohn K. 2000. Localization and topology of ratp28, a member of a novel family of putative steroid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1543:123-130.
- Nousiainen M, Sillje HH, Sauer G, Nigg EA, Korner R. 2006. Phosphoproteome analysis of the human mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5391-5396.
- Nutu M, Weijdegard B, Thomas P, Bergh C, Thurin-Kjellberg A, Pang Y, Billig H, Larsson DG. 2007. Membrane progesterone receptor gamma: tissue distribution and expression in ciliated cells in the fallopian tube. *Mol Reprod Dev* 74:843-850.
- Nutu M, Weijdegard B, Thomas P, Thurin-Kjellberg A, Billig H, Larsson DG. 2009. Distribution and hormonal regulation of membrane progesterone receptors beta and

- gamma in ciliated epithelial cells of mouse and human fallopian tubes. *Reprod Biol Endocrinol* 7:89.
- Paing MM, Temple BR, Trejo J. 2004. A tyrosine-based sorting signal regulates intracellular trafficking of protease-activated receptor-1: multiple regulatory mechanisms for agonist-induced G protein-coupled receptor internalization. *J Biol Chem* 279:21938-21947.
- Peluso JJ. 2006. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biol Reprod* 75:2-8.
- Peluso JJ. 2007. Non-genomic actions of progesterone in the normal and neoplastic mammalian ovary. *Semin Reprod Med* 25:198-207.
- Peluso JJ. 2011. Progesterone signaling mediated through progesterone receptor membrane component-1 in ovarian cells with special emphasis on ovarian cancer. *Steroids* 76:903-909.
- Peluso JJ, Gawkowska A, Liu X, Shioda T, Pru JK. 2009. Progesterone receptor membrane component-1 regulates the development and Cisplatin sensitivity of human ovarian tumors in athymic nude mice. *Endocrinology* 150:4846-4854.
- Peluso JJ, Liu X, Saunders MM, Claffey KP, Phoenix K. 2008. Regulation of ovarian cancer cell viability and sensitivity to cisplatin by progesterone receptor membrane component-1. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1592-1599.
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M. 2005. Expression and function of PAIRBP1 within gonadotropin-primed immature rat ovaries: PAIRBP1 regulation of granulosa and luteal cell viability. *Biol Reprod* 73:261-270.
- Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M. 2006. Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology* 147:3133-3140.
- Pieber D, Allport VC, Bennett PR. 2001. Progesterone receptor isoform A inhibits isoform B-mediated transactivation in human amnion. *Eur J Pharmacol* 427:7-11.
- Piel RB, 3rd, Shiferaw MT, Vashisht AA, Marcero JR, Praissman JL, Phillips JD, Wohlschlegel JA, Medlock AE. 2016. A Novel Role for Progesterone Receptor Membrane Component 1 (PGRMC1): A Partner and Regulator of Ferrochelatase. *Biochemistry* 55:5204-5217.
- Pru JK, Clark NC. 2013. PGRMC1 and PGRMC2 in uterine physiology and disease. *Front Neurosci* 7:168.

- Qiu HB, Lu SS, Ji KL, Song XM, Lu YQ, Zhang M, Lu KH. 2008. Membrane progesterin receptor beta (mPR-beta): a protein related to cumulus expansion that is involved in in vitro maturation of pig cumulus-oocyte complexes. *Steroids* 73:1416-1423.
- Rambags BP, van Tol HT, van den Eng MM, Colenbrander B, Stout TA. 2008. Expression of progesterone and oestrogen receptors by early intrauterine equine conceptuses. *Theriogenology* 69:366-375.
- Ramirez RJ, Gibson M, Kalenic J, Einzig S, Omar HA. 1998. In Vitro Vascular Relaxation to Progesterone and Its Metabolites in Human Umbilical and Placental Blood Vessels. *J Matern Fetal Investig* 8:61-65.
- Raza FS, Takemori H, Tojo H, Okamoto M, Vinson GP. 2001. Identification of the rat adrenal zona fasciculata/reticularis specific protein, inner zone antigen (IZAg), as the putative membrane progesterone receptor. *Eur J Biochem* 268:2141-2147.
- Reimers TJ, Ullmann MB, Hansel W. 1985. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. *Biol Reprod* 33:1227-1236.
- Rekawiecki R, Kowalik MK, Kotwica J. 2011. Nuclear progesterone receptor isoforms and their functions in the female reproductive tract. *Pol J Vet Sci* 14:149-158.
- Rekawiecki R, Kowalik MK, Kotwica J. 2014. Luteotropic and luteolytic factors regulate mRNA and protein expression of progesterone receptor isoforms A and B in the bovine endometrium. *Reprod Fertil Dev*.
- Rekawiecki R, Kowalik MK, Kotwica J. 2015. Cloning and expression of progesterone receptor isoforms A and B in bovine corpus luteum. *Reprod Fertil Dev* 27:1029-1037.
- Roberts RM, Xie S, Nagel RJ, Low B, Green J, Beckers JF. 1995. Glycoproteins of the aspartyl proteinase gene family secreted by the developing placenta. *Adv Exp Med Biol* 362:231-240.
- Robinson JE, Healey AE, Harris TG, Messent EA, Skinner DC, Taylor JA, Evans NP. 2000. The negative feedback action of progesterone on luteinizing hormone release is not associated with changes in GnRH mRNA expression in the Ewe. *J Neuroendocrinol* 12:121-129.
- Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction* 122:965-979.
- Rohe HJ, Ahmed IS, Twist KE, Craven RJ. 2009. PGRMC1 (progesterone receptor membrane component 1): a targetable protein with multiple functions in steroid signaling, P450 activation and drug binding. *Pharmacol Ther* 121:14-19.

- Rosenfeld CR. 1984. Consideration of the uteroplacental circulation in intrauterine growth. *Semin Perinatol* 8:42-51.
- Ross RL, Serock MR, Khalil RA. 2008. Experimental benefits of sex hormones on vascular function and the outcome of hormone therapy in cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev* 4:309-322.
- Runko E, Kaprielian Z. 2002. Expression of Vema in the developing mouse spinal cord and optic chiasm. *J Comp Neurol* 451:289-299.
- Runko E, Kaprielian Z. 2004. *Caenorhabditis elegans* VEM-1, a novel membrane protein, regulates the guidance of ventral nerve cord-associated axons. *J Neurosci* 24:9015-9026.
- Runko E, Wideman C, Kaprielian Z. 1999. Cloning and expression of VEMA: a novel ventral midline antigen in the rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 14:428-443.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Saint-Dizier M, Sandra O, Ployart S, Chebrou M, Constant F. 2012. Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cyclic and pregnant cows during the post-ovulation period. *Reprod Biol Endocrinol* 10:76.
- Schäubli M. 2005. Immunhistochemische Untersuchungen zu den Progesteron-, Östrogen- und Glukokortikoidrezeptoren in der interplazentomären Uteruswand des Rindes im peripartalen Zeitraum. In. Zürich. p 89 S.
- Schaubli M, Ritter N, Hassig M, Zerbe H, Bleul U, Boos A. 2008. Progesterone receptors, oestrogen receptor alpha and glucocorticoid receptors in the bovine intercaruncular uterine wall around parturition. *Anim Reprod Sci* 103:215-227.
- Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ. 2000. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. *Anim Reprod Sci* 60-61:145-160.
- Schnorr B, Kressin M. 2011. *Embryologie der Haustiere*, 6., aktualisierte Aufl. ed. Stuttgart: Enke.
- Schuler G, Greven H, Kowalewski MP, Doring B, Ozalp GR, Hoffmann B. 2008. Placental steroids in cattle: hormones, placental growth factors or by-products of trophoblast giant cell differentiation? *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 116:429-436.

- Schuler G, Wirth C, Klisch K, Pfarrer C, Leiser R, Hoffmann B. 1999. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod* 61:797-801.
- Schuster J, Karlsson T, Karlstrom PO, Poromaa IS, Dahl N. 2010. Down-regulation of progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1) in peripheral nucleated blood cells associated with premature ovarian failure (POF) and polycystic ovary syndrome (PCOS). *Reprod Biol Endocrinol* 8:58.
- Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. 2001. Progesterone and 17 beta-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sci* 69:815-827.
- Selmin O, Lucier GW, Clark GC, Tritscher AM, Vanden Heuvel JP, Gastel JA, Walker NJ, Sutter TR, Bell DA. 1996. Isolation and characterization of a novel gene induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Carcinogenesis* 17:2609-2615.
- Selmin O, Thorne PA, Blachere FM, Johnson PD, Romagnolo DF. 2005. Transcriptional activation of the membrane-bound progesterone receptor (mPR) by dioxin, in endocrine-responsive tissues. *Mol Reprod Dev* 70:166-174.
- Shankar R, Johnson MP, Williamson NA, Cullinane F, Purcell AW, Moses EK, Brennecke SP. 2010. Molecular markers of preterm labor in the choriodecidua. *Reprod Sci* 17:297-310.
- Shao W, Espenshade PJ. 2012. Expanding roles for SREBP in metabolism. *Cell Metab* 16:414-419.
- Sheldrick EL, Flick-Smith HC. 1993. Effect of ovarian hormones on oxytocin receptor concentrations in explants of uterus from ovariectomized ewes. *J Reprod Fertil* 97:241-245.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis MY, Garibaldi S, Baldacci C, Genazzani AR. 2004. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology* 145:5745-5756.
- Slonina D, Kowalik MK, Kotwica J. 2012. Expression of progesterone receptor membrane component 1, serpine mRNA binding protein 1 and nuclear progesterone receptor isoforms A and B in the bovine myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Dev* 58:288-294.

- Slonina D, Kowalik MK, Subocz M, Kotwica J. 2009. The effect of ovarian steroids on oxytocin-stimulated secretion and synthesis of prostaglandins in bovine myometrial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 90:69-75.
- Smith DF. 2000. Chaperones in progesterone receptor complexes. *Semin Cell Dev Biol* 11:45-52.
- Spencer TE, Bazer FW. 2002. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Front Biosci* 7:d1879-1898.
- Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod* 71:2-10.
- Sprekeler N, Kowalewski MP, Boos A. 2012. TRPV6 and Calbindin-D9k-expression and localization in the bovine uterus and placenta during pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol* 10:66.
- Stryer L, Stoll G. 1996. *Biochemie*, 4. Aufl. ed. Heidelberg etc.: Spektrum Akademischer Verlag.
- Suchanek M, Radzikowska A, Thiele C. 2005. Photo-leucine and photo-methionine allow identification of protein-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2:261-267.
- Sueldo C, Liu X, Peluso JJ. 2015. Progesterone and AdipoQ Receptor 7, Progesterone Membrane Receptor Component 1 (PGRMC1), and PGRMC2 and Their Role in Regulating Progesterone's Ability to Suppress Human Granulosa/Luteal Cells from Entering into the Cell Cycle. *Biol Reprod* 93:63.
- Tahir MZ, Reynaud K, Grimard B, Thoumire S, Chastant-Maillard S, Saint-Dizier M. 2013. Expression of nuclear and membrane progesterone receptors in the canine oviduct during the periovulatory period. *Reprod Fertil Dev* 25:1065-1076.
- Takahashi H, Haneda S, Kayano M, Matsui M. 2016. Differences in progesterone concentrations and mRNA expressions of progesterone receptors in bovine endometrial tissue between the uterine horns ipsilateral and contralateral to the corpus luteum. *J Vet Med Sci* 78:613-618.
- Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage PC, Funk WD. 2005. PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J Mol Evol* 61:372-380.
- Taylor AH, McParland PC, Taylor DJ, Bell SC. 2009. The cytoplasmic 60 kDa progesterone receptor isoform predominates in the human amniochorion and placenta at term. *Reprod Biol Endocrinol* 7:22.

- Thijssen JH. 2005. Progesterone receptors in the human uterus and their possible role in parturition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97:397-400.
- Thomas P. 2008. Characteristics of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) and progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and their roles in mediating rapid progestin actions. *Front Neuroendocrinol* 29:292-312.
- Thomas P, Pang Y. 2012. Membrane progesterone receptors: evidence for neuroprotective, neurosteroid signaling and neuroendocrine functions in neuronal cells. *Neuroendocrinology* 96:162-171.
- Thomas P, Pang Y. 2013. Protective actions of progesterone in the cardiovascular system: potential role of membrane progesterone receptors (mPRs) in mediating rapid effects. *Steroids* 78:583-588.
- Thomas P, Pang Y, Dong J. 2014. Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology* 155:1107-1119.
- Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y, Tubbs C. 2007. Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology* 148:705-718.
- Thorburn GD, Challis JR. 1979. Endocrine control of parturition. *Physiol Rev* 59:863-918.
- Tokumoto T, Hossain MB, Wang J. 2016. Establishment of procedures for studying mPR-interacting agents and physiological roles of mPR. *Steroids* 111:79-83.
- Tsai MJ, O'Malley BW. 1994. Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 63:451-486.
- Tubbs C, Thomas P. 2009. Progestin signaling through an olfactory G protein and membrane progestin receptor-alpha in Atlantic croaker sperm: potential role in induction of sperm hypermotility. *Endocrinology* 150:473-484.
- Ullmann MB, Reimers TJ. 1989. Progesterone production by binucleate trophoblastic cells of cows. *J Reprod Fertil Suppl* 37:173-179.
- Walters MR, Nemere I. 2004. Receptors for steroid hormones: membrane-associated and nuclear forms. *Cell Mol Life Sci* 61:2309-2321.
- Wang C, Liu Y, Cao JM. 2014. G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. *Int J Mol Sci* 15:15412-15425.

- Wei LL, Hawkins P, Baker C, Norris B, Sheridan PL, Quinn PG. 1996. An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity. *Mol Endocrinol* 10:1379-1387.
- Wei LL, Miner R. 1994. Evidence for the existence of a third progesterone receptor protein in human breast cancer cell line T47D. *Cancer Res* 54:340-343.
- Weigel NL. 1996. Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319 (Pt 3):657-667.
- Wendler A, Wehling M. 2013. PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity. *Steroids* 78:555-558.
- Weyrauch KD, Smollich A, Schnorr B. 1998. *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. Stuttgart: Enke.
- Winter T. 2007. Plazentareifung beim Rind und Retentio secundinarum : morphologisch-funktionelle Untersuchungen. In: *Inst. für Veterinär-Pathologie. Universität Leipzig: Universität Leipzig*. p 83 S.
- Wooding FB. 1982. The role of the binucleate cell in ruminant placental structure. *J Reprod Fertil Suppl* 31:31-39.
- Wooding FB. 1983. Frequency and localization of binucleate cells in the placentomes of ruminants. *Placenta* 4 Spec No:527-539.
- Wooding FB. 1992. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. *Placenta* 13:101-113.
- Wooding FB, Beckers JF. 1987. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. *Cell Tissue Res* 247:667-673.
- Wooding FB, Wathes DC. 1980. Binucleate cell migration in the bovine placentome. *J Reprod Fertil* 59:425-430.
- Wu W, Shi SQ, Huang HJ, Balducci J, Garfield RE. 2011. Changes in PGRMC1, a potential progesterone receptor, in human myometrium during pregnancy and labour at term and preterm. *Mol Hum Reprod* 17:233-242.
- Yamada O, Todoroki J, Kizaki K, Takahashi T, Imai K, Patel OV, Schuler LA, Hashizume K. 2002. Expression of prolactin-related protein I at the fetomaternal interface during the implantation period in cows. *Reproduction* 124:427-437.
- Zachariades E, Mparmpakas D, Pang Y, Rand-Weaver M, Thomas P, Karteris E. 2012. Changes in placental progesterone receptors in term and preterm labour. *Placenta* 33:367-372.

- Zhang L, Kanda Y, Roberts DJ, Ecker JL, Losel R, Wehling M, Peluso JJ, Pru JK. 2008. Expression of progesterone receptor membrane component 1 and its partner serpine 1 mRNA binding protein in uterine and placental tissues of the mouse and human. *Mol Cell Endocrinol* 287:81-89.
- Zhang M, Robitaille M, Showalter AD, Huang X, Liu Y, Bhattacharjee A, Willard FS, Han J, Froese S, Wei L, Gaisano HY, Angers S, Sloop KW, Dai FF, Wheeler MB. 2014. Progesterone receptor membrane component 1 is a functional part of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor complex in pancreatic beta cells. *Mol Cell Proteomics* 13:3049-3062.
- Zhang Y, Janssens SP, Wingler K, Schmidt HH, Moens AL. 2011. Modulating endothelial nitric oxide synthase: a new cardiovascular therapeutic strategy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301:H634-646.
- Zheng J, Johnson ML, Redmer DA, Reynolds LP. 1996. Estrogen and progesterone receptors, cell proliferation, and c-fos expression in the ovine uterus during early pregnancy. *Endocrinology* 137:340-348.
- Zhu Y, Bond J, Thomas P. 2003a. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2237-2242.
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P. 2003b. Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2231-2236.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Kurzformen verwendet:

Φ - Motive	YXX-Motive
Δ	Delta
®	Registered Trademark
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
%	Prozent
°C	Grad Celsius
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AF	Activation-Function
APS	Amonium Persulfat
BG	Blutgefäss
BGE	Blutgefässendothel
bPAG	bovines Pregnancy Assoziiertes Glycoprotein
bPL	bovines Plazentares Laktogen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline mit Tween
BTC	Binukleäre Trphoblastenzelle
Bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
C-Terminus	Carboxy-Terminus
C ₂₁	21 Kohlenstoffatome
Ca	Kalzium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CE	Chorionepithel
CK2	Casein-Kinase 2
Cl	Chlor
CL	Corpus Luteum (Gelbkörper)

cm	Zentimeter
C _t	Threshold Cycle
CyP450	Cytochrom P450
Cytb5	Cytochrom b5
D	Drüse
d.h.	das heisst
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAP1	Damage-Associated-Response-Protein
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DE	Drüsenepithel
DF	Deviation Factor
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNase	Desoxyribonuklease
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (und andere)
F	Fibroblast
FECH	Ferrochelataase
g	Erdschwerebeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GLP-1R	Glucagon-Like-Peptide-1-Rezeptor
GMZ	glatte Muskelzelle
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
h	Stunde
H	Wasserstoff
HCL	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
hiZA2	humanes Inner Zone Antigen 2
HRP	Horseradish Peroxidase
Hpr6	Häm-Progesteron-Rezeptor 6
Hpr6.6	Häm-Progesteron-Rezeptor 6.6
HRE	Hormone-Response-Element
HSD	Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HSP	Hitzeschockprotein
ID	Inhibitory Domain

IHC-Puffer	Immunohistochemiepuffer
Insig-1	Insulin-Induced-Gene-1
ITAMS	Immunreceptor-Tyrosine-Based-Activation-Motifs
IZA	Inner Zone Antigen
K	Kalium
Kd	Dissoziationskonstante
kDA	Kilodalton
LBD	Ligand-Binding-Domain
LH	Lutenisierendes Hormon
M	Molar
MAP	Mitogen-Activated-Protein
MAPR	Progesteronrezeptorproteinfamilie
Mg	Magnesium
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MM	Myometrium
mPR	membrane Progestin Receptor
mRNA	Messenger-RNA
MS	Maternales Stroma
n	Anzahl
N-Terminus	Amino-Terminus
Na	Natrium
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nM	Nanomolar
O ₂	Sauerstoff
OE	Oberflächenepithel
p	p-Wert
P	Phosphor
P4	Progesteron
PAIRBP1	Plasminogen-Activator-Inhibitor-mRNA-Binding-Protein 1
PAQR	Progestin- und AdipoQ-Rezeptoren
PCR	Polymerase Chain Reaction

PGF _{2α}	Prostaglandin F2α
PGR	nukleärer Progesteronrezeptor
PGRMC	Progesterone Receptor Membrane Component = Progesteronerezeptor-Membrankomponente
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCAP	SREBP-Cleavage-Activating-Protein
SDS-Page	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
s	Sekunde
SERBP1	Serpine1-mRNA-Binding-Protein
SH	Src-Homologie
SIGC	Spontaneously Immortalized Granulosa Cells
SOD	Standardized Optical Density
SREB	Sterol-Regulatory-Element-Binding-Protein
SUZ12	Polycomb Protein SUZ12
TAMRA	Tetramethylrhodamin-acid
TGC	Trophoblast Giant Cells
™	Trademark
U	Units
V	Volt
VEGF-A	Vascular Endothelial Growth Factor A
VemA	Ventral Midline Antigen
W	Watt
\bar{x}	Mittelwert
z.B.	zum Beispiel

9.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER GEWEBSSCHICHTEN DER FETOMATERNALEN TRANSFERSTRECKE, MODIFIZIERT NACH SCHNORR UND KRESSIN (SCHNORR AND KRESSIN, 2011)	8
ABBILDUNG 2: AUSSCHNITT AUS DEM BOVINEN PLAZENTOM, MODIFIZIERT NACH SCHNORR UND KRESSIN (SCHNORR AND KRESSIN, 2011)	8
ABBILDUNG 3: BOVINE INTERPLAZENTOMÄRE REGION, MODIFIZIERT NACH DAVIES ET AL. (DAVIES ET AL., 2000)	9
ABBILDUNG 4: STRUKTURFORMEL VON PROGESTERON	11
ABBILDUNG 5: "DIAGRAM OF THE PATHWAYS OF HUMAN STEROIDOGENESIS". WIKIJOURNAL OF MEDICINE (HÄGGSTRÖM AND RICHFIELD, 2014)	11
ABBILDUNG 6: PROGESTERON UND SEINE POTENZIELLEN REZEPTOREN	13
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN ISOFORMEN DER PGR DES MENSCHEN, MODIFIZIERT NACH KOWALIK ET AL. (KOWALIK ET AL., 2013A)	15
ABBILDUNG 8: MÖGLICHE FUNKTIONEN DES PGRMC1, MODIFIZIERT NACH CAHILL ET AL. (CAHILL ET AL., 2016)	20
ABBILDUNG 9: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER RELATIVEN mRNA-EXPRESSION VON PGRMC1 MITTELS REALTIME(TAQMAN®)-PCR WÄHREND DER TRÄCHTIGKEIT BEIM RIND (XG X SD).....	50
ABBILDUNG 10: PROTEINEXPRESSION VON PGRMC1 UND DEM VERWENDETEN REFERENZPROTEIN β -AKTIN MITTELS WESTERN BLOT WÄHREND DER TRÄCHTIGKEIT BEIM RIND	52
ABBILDUNG 11: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PROTEINEXPRESSION VON PGRMC1.....	53
ABBILDUNG 12: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC1 IN DER UTERUSWAND, 9. MONAT DER TRÄCHTIGKEIT.....	55
ABBILDUNG 13: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC1 IN DER UTERUSWAND, 4. MONAT DER TRÄCHTIGKEIT.....	55
ABBILDUNG 14: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC1 IM MYOMETRIUM, 3. MONAT DER TRÄCHTIGKEIT.....	56
ABBILDUNG 15: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC1 IM PLAZENTOM, 2. TRÄCHTIGKEITSMONAT	56
ABBILDUNG 16: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC1 IN DER INTERPLAZENTOMÄREN BOVINEN UTERUSWAND WÄHREND DES TRÄCHTIGKEITSVERLAUFS	58

ABBILDUNG 17: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC1 IM BOVINEN PLAZENTOM WÄHREND DES TRÄCHTIGKEITSVERLAUFS	60
ABBILDUNG 18: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER RELATIVEN mRNA-EXPRESSION VON PGRMC1 MITTELS REALTIME(TAQMAN®)-PCR WÄHREND DER TRÄCHTIGKEIT BEIM RIND (XG x SD).....	61
ABBILDUNG 19: PROTEINEXPRESSION VON PGRMC2 UND DES VERWENDETEN REFERENZPROTEINS β -AKTIN MITTELS WESTERN BLOT WÄHREND DER TRÄCHTIGKEIT BEIM RIND	63
ABBILDUNG 20: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER PGRMC2 PROTEINEXPRESSION RELATIV ZU DER VON β -AKTIN GEMESSEN ANHAND DER OPTISCHEN DICHTEN, MIT HILFE DER IMAGE LAB SOFTWARE	64
ABBILDUNG 21: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC2 IM OBERFLÄCHLICHEN BOVINEN ENDOMETRIUM, 7. MONAT DER TRÄCHTIGKEIT	66
ABBILDUNG 22: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC2 IM TIEFEN BOVINEN ENDOMETRIUM, 1. MONAT DER TRÄCHTIGKEIT	66
ABBILDUNG 23: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC2 IM BOVINEN ENDOMETRIUM, 1. MONAT DER TRÄCHTIGKEIT	67
ABBILDUNG 24: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC2 IM MYOMETRIUM, 1. MONAT DER TRÄCHTIGKEIT	67
ABBILDUNG 25: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC2 IN DER BOVINEN UTERUSWAND WÄHREND DER TRÄCHTIGKEIT	69
ABBILDUNG 26: IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON PGRMC2 IM BOVINEN PLAZENTOM WÄHREND DER TRÄCHTIGKEIT	71

9.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PROTOKOLL FÜR DIE MASCHINELLE DEHYDRIERUNG UND PARAFFININFILTRATION DER GEWEBEPROBEN MITHILFE DES GEWEBEINFILTRATIONSAUTOMATEN	32
TABELLE 2: ZUSAMMENSETZUNG DES DNASE-MIX	34
TABELLE 3: ZUSAMMENSETZUNG DES DYNAMO cDNA SYNTHESIS KIT	35
TABELLE 4: REAKTIONSBEDINGUNGEN DER REVERSE TRANSKRIPTION	35
TABELLE 5: ZUSAMMENSETZUNG DES REAKTIONSVOLUMENS FÜR DIE REALTIME(TAQMAN®)- PCR	37
TABELLE 6: SEQUENZEN DER PRIMER UND SONDEN	38
TABELLE 7: REAKTIONSBEDINGUNGEN DER REALTIME(TAQMAN®)-PCR	38
TABELLE 8: ZUSAMMENSETZUNG DES 12%IGEN POLYACRYLAMID-GELS	41
TABELLE 9: PRIMÄRANTIKÖRPER FÜR DEN WESTERN BLOT	43
TABELLE 10: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER FÜR DEN WESTERN BLOT	44
TABELLE 11: PRIMÄRANTIKÖPER UND DIE ENTSPRECHENDEN VERDÜNNUNGEN	48
TABELLE 12: SEKUNDÄRANTIKÖRPER UND DIE ENTSPRECHENDEN VERDÜNNUNGEN	48
TABELLE 13: IMMUNHISTOCHEMIEPROTOKOLL: PGRMC1-NACHWEIS	112
TABELLE 14: IMMUNHISTOCHEMIEPROTOKOL: PGRMC2-NACHWEIS	114

9.4 Immunhistochemieprotokolle

Tabelle 13: Immunhistochemieprotokoll: PGRMC1-Nachweis

Tag	Dauer	Arbeitsgang
1		Entparaffinieren und Rehydrieren
	2 x 10 Minuten	Xylol
	2 x 2 Minuten	100% Ethanol
	2 x 2 Minuten	94% Ethanol
	2 x 2 Minuten	70% Ethanol
	5 Minuten	spülen in fließendem Leitungswasser
		Antigen-Demaskierung
	5 Minuten	Zitratpuffer, RT
	3 x 5 Minuten	in erwärmtem Zitratpuffer, Mikrowelle, 600 Watt
	20 Minuten	abkühlen in frischem Zitratpuffer, RT
	5 Minuten	spülen in fließendem Leitungswasser
		Hemmung der endogenen Enzymaktivität
	30 Minuten	3% H ₂ O ₂ und Methanol
	5 Minuten	spülen in IHC-Puffer
		Blockieren mit Normalserum: Proteinblock
	20 Minuten	inkubieren mit Normalserum, 100µl / Schnitt (10 % Ziegeneserum)
		Inkubation mit Primärantikörper
	über Nacht	50µl /Schnitt PGRMC1-Antikörper, Verdünnung 1:750

Fortsetzung Tabelle 11: Immunhistochemieprotokoll: PGRMC1-Nachweis

<i>Tag</i>	<i>Dauer</i>	<i>Arbeitsgang</i>
2		<i>Inkubation mit Sekundärantikörper</i>
	2 x 5 Minuten	spülen in IHC-Puffer
	30 Minuten	100µl/ Schnitt Sekundärantikörper, Kaninchen-IgG, Verdünnung: 1:100
	5 Minuten	spülen in IHC-Puffer
		Detektion: ABC-Methode und DAB-Färbung
	30 Minuten	Inkubation mit ABC-Komplex, 100µl/ Schnitt
	5 Minuten	spülen in IHC-Puffer
	2 Minuten	entwickeln mit DAB
	10 Minuten	spülen mit fließendem Leitungswasser
		Gegenfärben
	3 x Eintauchen	Hämalaun
	5 Minuten	spülen in fließendem Leitungswasser
		Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
	2 x 20 Sekunden	70% Ethanol
	2 x 2 Minuten	94% Ethanol
	2 x 2 Minuten	100% Ethanol
	2 x 5 Minuten	Xylol
		Eindecken mit Pertex®

Tabelle 14: Immunhistochemieprotokoll: PGRMC2-Nachweis

<i>Tag</i>	<i>Dauer</i>	<i>Arbeitsgang</i>
1		Entparaffinieren und Rehydrieren
	2 x 10 Minuten	Xylol
	2 x 2 Minuten	100% Ethanol
	2 x 2 Minuten	94% Ethanol
	2 x 2 Minuten	70% Ethanol
	5 Minuten	spülen in fließendem Leitungswasser
		Antigen-Demaskierung
	5 Minuten	Zitratpuffer, RT
	3 x 5 Minuten	in erwärmtem Zitratpuffer, Mikrowelle, 600 Watt
	20 Minuten	abkühlen in frischem Zitratpuffer, RT
	5 Minuten	spülen in fließendem Leitungswasser
		Hemmung der endogenen Enzymaktivität
	30 Minuten	3% H ₂ O ₂ und Methanol
	5 Minuten	spülen in IHC-Puffer
		Blockieren mit Normalserum: Proteinblock
	20 Minuten	inkubieren mit Normalserum, 100µl / Schnitt (10 % Pferdeserum)
		Inkubation mit Primärantikörper
	über Nacht	50µl /Schnitt PGRMC2-Antikörper, Verdünnung 1:200

Fortsetzung: Tabelle 12: Immunhistochemieprotokoll: PGRMC2-Nachweis

<i>Tag</i>	<i>Dauer</i>	<i>Arbeitsgang</i>
2		<i>Inkubation mit Sekundärantikörper</i>
	2 x 5 Minuten	spülen in IHC-Puffer
	30 Minuten	100µl/ Schnitt Sekundärantikörper, Maus-IgG, Verdünnung: 1:100
	5 Minuten	spülen in IHC-Puffer
		<i>Detektion: ABC-Methode und DAB-Färbung</i>
	30 Minuten	Inkubation mit ABC-Komplex, 100µl/ Schnitt
	5 Minuten	spülen in IHC-Puffer
	2 Minuten	entwickeln mit DAB
	10 Minuten	spülen mit fließendem Leitungswasser
		<i>Gegenfärben</i>
	3 x Eintauchen	Hämalaun
	5 Minuten	spülen in fließendem Leitungswasser
		<i>Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe</i>
	2 x 20 Sekunden	70% Ethanol
	2 x 2 Minuten	94% Ethanol
	2 x 2 Minuten	100% Ethanol
	2 x 5 Minuten	Xylol
		<i>Eindecken mit Pertex®</i>

9.5 Puffer und Lösungen

10 X Reaktions-Puffer(DNase-Behandlung), pH 8.3

200mM Tris-HCL

20mM MgCl_2

DNase I-Mix

1 U/ μl DNase I

50% Glycerol

10mM Tris-HCL (pH 7.5)

10mM CaCl_2

10mM MgCl_2

Formaldehyd 4% , gepuffert, pH 7,0, für die Gewebefixierung

Formol (40% Formaldehydlösung)	500 ml
--------------------------------	--------

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	20 g
---	------

Na_2HPO_4	32,5 g
---------------------------	--------

Steriles Aqua bidest.	Ad 500 ml
-----------------------	-----------

Zitratpuffer (10mM, pH 6.0)

Stammlösung A: 0.1 M Zitronensäure

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$	21.0g
--	-------

Steriles Aqua bidest.	Ad 1000ml
-----------------------	-----------

Stammlösung B: 0.1 M Natriumcitrat

$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \times 2\text{H}_2\text{O}$	29.41g
--	--------

Steriles Aqua bidest.	Ad 1000ml
-----------------------	-----------

Gebrauchslösung

Stammlösung A	9ml
---------------	-----

Stammlösung B	41ml
---------------	------

Steriles Aqua bidest.	450ml
-----------------------	-------

IHC-Puffer (Immunhistochemiepuffer) 10x, pH 7,2 -7,4

Na ₂ HPO ₄	12g
KH ₂ PO ₄	2g
KCl	2g
NaCl	80g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

IHC-Puffer (Immunhistochemiepuffer) 1x / 0,3% Triton X-100, pH 7,2 -7,4

IHC-Puffer	10x 100 ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml
nach Einstellen des pH-Wertes (7,2 – 7,4) zugeben:	
Triton X-100	3 ml

Net-2 Puffer pH 7,4 (Lagerung bei +4 °C):

NaCl (300 mM)	4,384 g
Tris-HCl (50 mM)	1,97 g
Nonidet P (NP) -40 (0,05%)	125 µl
Steriles bidest. Wasser	Ad 250 ml

4x Sample Puffer für Western Blot, Lagerung bei -20 °C):

H ₂ O	16 ml
0,5 M Tris pH 6.8	4 ml
Glycerol	3,2 ml
SDS 10%	6,4 ml
β-Mercaptoethanol	1,6 ml
0,2% Bromphenolblau	32 ml

Lower Tris Puffer pH 8,8

Tris Base	31,46g
Tris HCl	3,72g
SDS 10%	8ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 200 ml

Upper Tris Puffer pH 6,8

Tris Base	0,182g
Tris HCl	3,72
SDS 10%	2ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 50ml

Laufpuffer 10x

Tris Base	30,25g
Glyzin	144,1g
SDS	10g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000ml

Gebrauchslösung 1x

Laufpuffer 10x	100ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000ml

Transferpuffer 10x

Tris Base	24,2g
Glyzin	112,4g
SDS	1g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000ml

Gebrauchslösung 1x:

Methanol 10 %	100ml
Transferpuffer 10x	100ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000ml

PBS (Phosphat buffered saline) 10 x

NaCl	80g
KCL	2g
Na ₂ HPO ₄	14,4g
KH ₂ PO ₄	2,4g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000ml

PBS (Phosphat buffered saline) mit 1,25% Tween 20

PBS 10 x	100ml
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000ml
Tween 20	2,5ml

0,1 M Glycin, pH 2,6 für den Western Blot

Glycin	1,5g
Steriles bidest. Wasser	Ad 1000 ml

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all denen bedanken, die an der Entstehung dieser Dissertation direkt oder indirekt beteiligt waren:

- Herrn Prof. Dr. Alois Boos für das Überlassen der interessanten Fragestellung und die Betreuung beim Erstellen dieser Arbeit, sowie der sorgfältigen Durchsicht des Manuskripts
- Herrn Prof. Dr. Ulrich Bleul für die Anfertigung des Korreferats
- Herrn Prof. Dr. Mariusz Kowalewski für die Einführung und Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten
- Frau PhD Magdalena Kowalik und dem Institute of Animal Reproduction and Food Research in Olsztyn für die Unterstützung und Möglichkeit die RealTime-PCR in ihrem Labor durchzuführen
- Frau Elisabeth Hoegger für ihre Hilfe und Unterstützung bei allen immunhistochemischen Arbeiten
- Frau Stefanie Ihle für die Hilfe und Unterstützung im Molekularbiologielabor
- Frau Katrin Süss für die Hilfe bei der Organisation der Probensammlung
- Herrn Dr. Clemens Bauer und dem SBZ Schlachtbetrieb Zürich AG für die Bereitstellung des Probenmaterials
- Hanspeter Inauen und Anton Steiner für ihre herzerfrischende Art und tatkräftige Hilfe bei der wöchentlichen Sammlung der Proben im Schlachthof

- Jeannette Attiger, Sophie Zatta, Stefanie Ihle und Ricardo Fernandez Rubia für die seelische und fachliche Unterstützung und natürlich für die immer gute Stimmung im Büro
- Marta Nowak, Bettina Lanfranchi und Dr. Aykut Gram für ihre Unterstützung und die vielen lustigen Momente während der Arbeit
- Hanna Alves, Ann-Christin Diepers, Anke Baumeister, Britta Ruhmann und Lara Steinhoff für die vielen tollen und vor allem lustigen gemeinsamen Momente während unseres Studiums und darüber hinaus
- Sina Fischer, Gesa Lonnemann, Laura Mohns und Eva Bollingerfehr für die langjährige Freundschaft und den Beistand in allen Lebenslagen

Meinen Geschwistern Jan und Melanie Beyer möchte ich für ihr immer offenes Ohr und ihre positive Bestärkung danken.

Meiner grossen Liebe Philipp Rauch danke ich sehr, dass er in dieser Zeit immer an meiner Seite war und mich in allen Belangen bedingungslos mit seiner positiven Art unterstützt hat. Danke für alles!

Am meisten aber möchte ich meinen Eltern Angelika und Peter Beyer danken für ihre unermüdliche Unterstützung bei Allem, was ich bis jetzt in meinem Leben getan habe! Und ganz besonders für die Ermöglichung meines Berufswunsches. Danke für eure Liebe!

11 Lebenslauf

Name:	Nora Maria Beyer
Geburtsdatum:	06.01.1990
Geburtsort:	Langenhagen, Deutschland
Nationalität:	Deutsch
August/1996-Juli/2000	Grundschule , Plockhorst, Deutschland
August/2000- Juni/2002	Orientierungsstufe , Edemissen, Deutschland
Juli/2002 –Juli/2004	Gymnasium am Silberkamp , Peine, Deutschland
August/2004 – Juni/2009	Ratsgymnasium , Peine, Deutschland
19. Juni 2009	Abitur , Ratsgymnasium, Peine, Deutschland
	Leistungsfächer: Biologie, Mathematik, Politik
Oktober/2009 – März/2015	Studium der Veterinärmedizin , Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland
September/2012- Juli/2013	Studium der Veterinärmedizin , ERASMUS, Universität Zürich, Schweiz
13. März 2015	Staatsexamen Veterinärmedizin , Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland
27. März 2015	Approbation als Tierärztin , Tierärztekammer Niedersachsen, Hannover, Deutschland
Juli/2015 - Dezember/2017	Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Alois Boos und Anstellung als Assistentin am Veterinär-Anatomischen Institut der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich